

Struktur und Bindungsverhalten der
N-terminalen p85 src homology 2 Domäne
mittels NMR-Spektroskopie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt dem Fachbereich Chemische und pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von

Bernd Weyrauch

aus Darmstadt

Frankfurt am Main (2006)

D F 1

vom Fachbereich Chemische und pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: PD Dr. Ulrich Günther, Prof. Dr. Heinz Rüterjans

Datum der Disputation:

Danksagung

Ich danke allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren.

Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Prof. Dr. Heinz Rüterjans für die überaus freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie für die Durchsicht und Korrektur der Arbeit.

Des weiteren gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. Ulrich Günther für die Überlassung des Themas sowie für die umfassende wissenschaftliche und technische Betreuung der Arbeit.

Herrn Dr. Primož Pristovsek danke ich besonders für sein offenes Ohr und seine Hilfe bei der Einarbeitung in das Programm NMR2S.

Einen besonderen Dank für die fachliche und technische Unterstützung möchte ich allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe aussprechen.

Abkürzungen

Abl	Abelson Mäuseleukämie
Crk	Vogelsarkom Virus
CSF-1R	Macrophage colony stimulating factor receptor
CSP	Änderung der chemischen Verschiebung (chemical shift perturbation)
DYANA	Dynamics algorithm for NMR applications
Fps	Fujinami Vogelsarkom
GAP	GTPase aktivierendes Protein
Grb2	Growth factor receptor bound protein 2
HSQC	Heteronuclear single quantum spectroscopy
Nck	Nck Adapterprotein
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
NOE	Kern-Overhauser-Effekt
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
PI3K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
PLC γ 1	Phospholipase C- γ
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
pY	Phosphotyrosin
RMSD	root mean square deviation, Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung
RPTK	Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinase
SH2	src homology 2 Domäne
SH3	src homology 3 Domäne
SHC	Src Homologous and Collagen-like protein
Src	Rous' Vogelsarkom
TALOS	Torsion angle likeness obtained by shifts
TOCSY	Total correlation spectroscopy

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Struktur und Funktion von SH2-Domänen	4
1.2	Kernresonanz-Spektroskopie	12
1.2.1	Grundlagen der NMR-Spektroskopie	13
1.3	Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie	16
2	Material und Methoden	20
2.1	Herstellung der Proteinproben	20
3	NMR-Methoden	20
3.1	Pulssequenzen für die sequentielle Zuordnung	20
3.1.1	HNCA-Experiment	20
3.1.2	HN(CO)CA-Experiment	21
3.2	Pulssequenzen für die Seitenkettenuordnung	23
3.2.1	3D-TOCSY-(^{15}N , ^1H)-HSQC-Experiment	24
3.2.2	(H)C(CO)NH-Experiment	24
3.2.3	3D-HCCH-TOCSY-Experiment	25
3.3	Experimente zur Strukturrechnung	26
3.3.1	3D- ^{15}N -NOESY-HSQC-Experiment	26
3.3.2	3D- ^{13}C -NOESY-HSQC-Experiment	26
3.4	Prozessierung und Referenzierung der Spektren	27
3.4.1	Prozessierung	27
3.4.2	Referenzierung	28
3.5	Strukturbestimmung von Proteinen	28
3.5.1	Halbautomatische NOE-Zuordnung mit NMR2S	30
3.5.2	Torsionswinkelvorhersage mit TALOS	33
3.5.3	Distanzgeometrie-Rechnungen mit DYANA	35
3.5.4	Energieminimierung mit DISCOVER	38
4	Ergebnisse und Diskussion	40
4.1	Zuordnung der Resonanzen	40
4.1.1	Zuordnung der Resonanzen der freien Mutante P395S	40

4.1.2	Zuordnung der Resonanzen der Mutante P395S mit gebundenem PDGFr	40
4.2	Struktur des freien Proteins	41
4.2.1	Vergleich der Struktur des freien Proteins mit dem Wildtyp	47
4.2.2	Änderung der chemischen Verschiebungen von P395S gegenüber dem Wildtyp	49
4.3	Struktur des Komplexes	51
4.3.1	Änderung der chemischen Verschiebungen von P395S bei Bindung von PDGFr	56
4.3.2	Änderung der chemischen Verschiebungen von P395S bei Bindung von Polyomavirus-MiddleT-Antigen	62
4.4	Diskussion	65
5	Zusammenfassung	71
A	Anhang	74
A.1	Steuerdateien für die Strukturrechnung mit DYANA	74
A.1.1	dyana.csh	74
A.1.2	init.dya	74
A.2	Steuerdatei für die Energieminimierung mit DISCOVER	75
B	Literatur	79

1 Einleitung

1.1 Struktur und Funktion von SH2-Domänen

Damit eine Zelle auf ihre Umgebung reagieren kann, müssen eine Reihe von regulierten molekularen Ereignissen ablaufen. Signalmoleküle binden an zelluläre Rezeptoren und lösen so viele verschiedene intrazelluläre Signalwege aus, die Veränderungen in der Zelle hervorrufen. Die Rezeptoren an der Oberfläche von Zellen erkennen eine Vielzahl von Peptidhormonen und besitzen Proteintyrosinkinase-Aktivität. Diese Aktivität wird durch Bindung eines extrazellulären Liganden gesteuert. Die Phosphorylierung von Tyrosin dient als molekularer Schalter zur Regulierung intrazellulärer Signalwege durch Proteine, die zum Beispiel SH2-Domänen enthalten.

Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen (RPTK) sind Proteine, die als Regulatoren für Zellwachstum und -differenzierung fungieren. RPTKs enthalten eine extrazelluläre Domäne, ein Transmembranelement sowie eine intrazelluläre katalytische Region. Der extrazelluläre Bereich wird von Regionen, die reich an Cystein sind, dominiert. Der Transmembranbereich ist hydrophob und spielt eine wesentliche Rolle bei der Rezeptordimerisierung, während der Bereich im Inneren der Zelle die Tyrosin-Kinase-Domäne sowie nichtkatalytische Sequenzen enthält, die nach der Aktivierung der RPTK als Substrat zur Transphosphorylierung dienen. Diese Eigenschaften sind allen RPTKs gemein, jedoch gibt es Unterschiede in speziellen Bereichen der extrazellulären Domäne sowie der Struktur der Tyrosin-Kinase-Domäne. Aus diesen Unterschieden wurden verschiedene Familien von RPTKs abgeleitet, die in Abb. 1 dargestellt sind. So stellen etwa der Epidermale-Wachstumsfaktorrezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR), der platelet-derived growth factor receptor (PDGFr), der Insulin-Rezeptor (IR), der Nervenwachstumsfaktorrezeptor (nerve growth factor receptor, NGFR) und der Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptor (fibroblast growth factor receptor, FGFR) fünf Unterfamilien der RPTKs dar. Der EGFR, PDGFr, NGFR und FGFR unterscheiden sich im wesentlichen in ihren extrazellulären Ligandenbindungs-

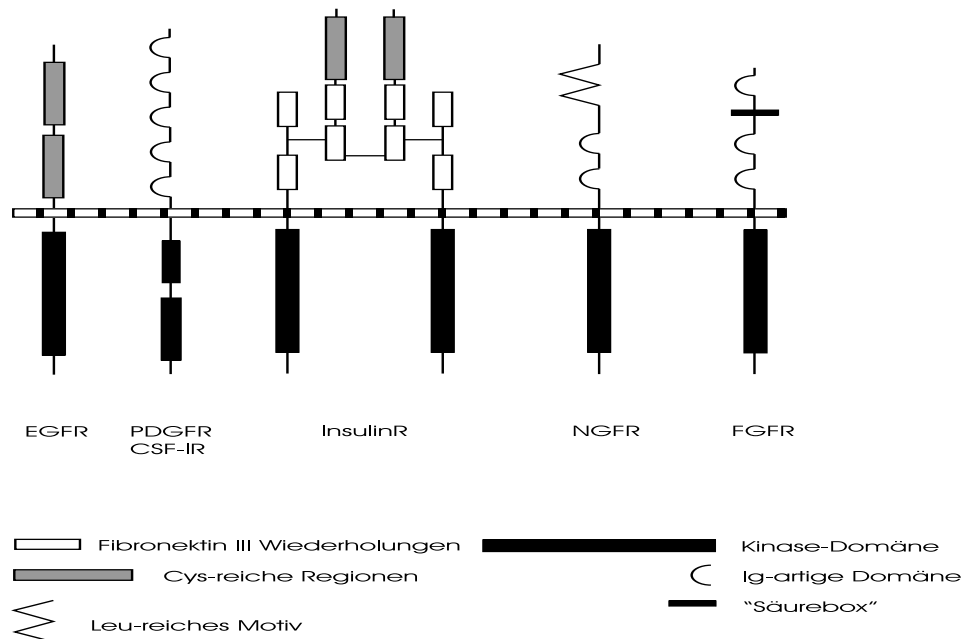


Abbildung 1: Schematische Darstellung von fünf Familien der Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen.

Domänen. PDGFR besitzt außerdem noch eine zusätzliche Kinase in der katalytischen Domäne. Der IR verfügt über eine andere Rezeptorarchitektur.

Die Aktivierung von RPTKs geschieht durch Bindung eines Liganden an den extrazellulären Teil der RPTK. Dadurch wird die Dimerisierung des Rezeptors eingeleitet. Des weiteren wird die Kinaseaktivität angeregt und es kommt zu intermolekularer Autophosphorylierung. Diese Phosphorylierung geschieht zum größten Teil in nichtkatalytischen Regionen. Die Rezeptor-Tyrosin-Kinaseaktivität ist notwendig für die mitogene Reaktion. Mutanten ohne diese Aktivität zeigen keine mitogene Antwort mehr auf Wachstumsfaktorstimulation.

Die Identifikation von Zelloberflächenrezeptoren für Wachstumsfaktoren mit spezifischer Tyrosin-Kinaseaktivität und die Entdeckung der Rolle, die diese Rezeptoren bei Zellwachstum, -differenzierung und -wachstum spielen, hat ein großes Interesse an ihrem Wirkungsmechanismus ausgelöst.

RPTKs vermitteln nach der Bindung ihrer Liganden Autophosphorylierung sowie Serin- und Tyrosinphosphorylierung von zellulären Proteinen. Stimulation von ruhenden Fibroblasten durch PDGF wird beispielweise begleitet von Autophosphorylierung des PDGFr und erhöhter Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine. Die PDGFr-Kinase-Domäne besitzt gegenüber anderen Tyrosinkinasen einen Bereich, der zusammen mit anderen Stellen der intrazellulären Seite des PDGFr tyrosinphosphoryliert wird. Diese Stellen der Phosphorylierung auf dem menschlichen β -PDGFr dienen als Bindestellen für Signalmoleküle. Phosphatidylinositol-3'-Kinase bindet spezifisch an Phosphotyrosin in der Kinase-Einschubregion des aktivierten β -PDGFr. Als Bindungsstellen werden die Tyrosine 740 und 751 innerhalb des Einschubs charakterisiert. Eine Mutation dieser beiden Reste zu Phenylalanin führt zum vollständigen Verlust der Fähigkeit zur Bindung von PDGFr an PI3K.

Der PDGFr bindet weitere Signalmoleküle wie z.B. p21ras GTPase-aktivierendes Protein (GAP), Phospholipase C- γ (PLC γ 1) und die Syp-Phosphotyrosin-Phosphatase.

Alle diese Wechselwirkungen beinhalten die SH2-Domänen der Signalmoleküle sowie spezifische phosphorylierte Tyrosine im Rezeptor. Als Konsequenz der Bindung an den aktivierten PDGFr werden die SH2-enthaltenden Proteine ebenfalls phosphoryliert. Zusätzlich können Mitglieder der Src-Familie von cytoplasmatischen Tyrosinkinasen, die ebenfalls SH2-Domänen enthalten, an den aktivierten PDGFr binden.

Der Insulin-Rezeptor (IR) besitzt einen etwas anderen Mechanismus zur Aktivierung von Effektormolekülen. SH2-enthaltende Proteine werden nicht direkt nach Stimulation durch Insulin an den Rezeptor gebunden. Vielmehr führt die Aktivierung des IR zur Autophosphorylierung und zur Tyrosinphosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrates 1 (IRS1), welches an SH2-enthaltende Signalmoleküle wie PI3K, Grb2, Syp oder Nck bindet.

Die Rezeptor-Autophosphorylierung dient als Schalter, durch den die Bindung eines aktivierten Rezeptors an ein Signalmolekül ausgelöst wird. Obwohl sich alle bisher genannten Signalmoleküle in ihrer katalytischen Aktivität, Struktur und zellulären Funktion unterscheiden, besitzen sie alle als Gemeinsamkeit eine oder mehrere SH2-Domänen. Entdeckt worden ist die

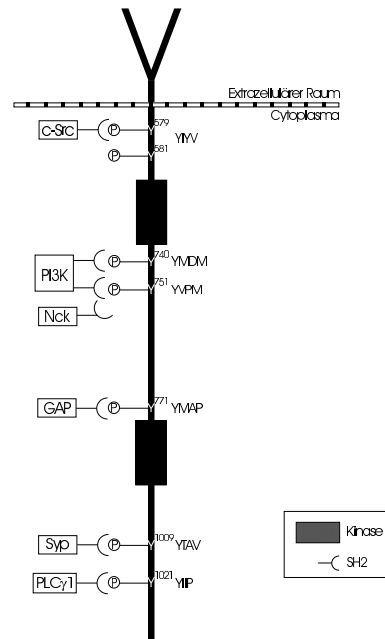


Abbildung 2: Die Bindungsstellen für verschiedene SH2-Domänen auf dem PDGF-Rezeptor.

SH2-Domäne ursprünglich als eine 100 Aminosäuren lange Sequenz in Src Onkoproteinen [1]. SH2-Domänen sind hochkonserviert. Es gibt etwa 35% Sequenzhomologie unter allen SH2-Domänen. Sie binden spezifisch und sequenzabhängig an phosphorylierte Sequenzen und sind in vielen cytoplasmatischen Signalmolekülen vorhanden [1]. Die SH2-Domänen lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Zum einen in Signalproteine, die eine katalytische Aktivität besitzen wie z.B. die intrazellulären Tyrosinkinasen der Src-, Fps- und Abl-Familien, PLC γ 1 und PLC γ 2, GAP und tyrosinspezifische Phosphatasen wie Syp (SH2-containing tyrosin phosphatase). Die zweite Gruppe beinhaltet Moleküle, die keine feststellbare enzymatische Aktivität besitzen. Dazu zählen Grb2, SHC, Nck und Crk. Diese Moleküle fungieren als Bindestellen zwischen RPTKs und Signalmolekülen, die selbst keine SH2-Domäne besitzen. Die SH2-Domänen der Proteine GAP, PLC γ 1, PI3K und Src sind direkt an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt. In Abb. 2 sind als Beispiel die Bindestellen auf dem PDGFr dargestellt. Src, PI3K, GAP, Syp und

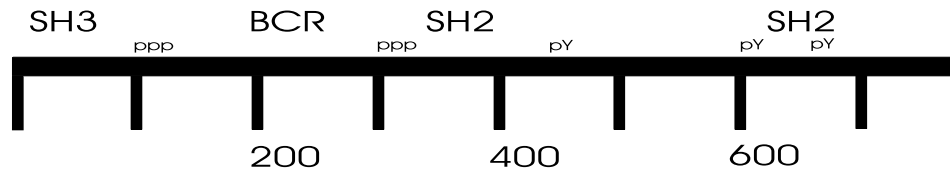


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Zusammensetzung der regulatorischen p85 Untereinheit der PI3K.

PLC γ 1 binden die an die Phosphotyrosine Y579/Y581, Y740/Y751, Y771, Y1009 und Y1021. Allerdings ist die Eigenschaft der SH2-Domänen, phosphotyrosinabhängige Wechselwirkungen weiterzuleiten, nicht auf Rezeptoren begrenzt; auch cytoplasmatische Moleküle, die Phosphotyrosin (pY) enthalten, können gebunden werden [2]. Es ist gezeigt worden, dass die Bindung an phosphotyrosinenthaltende Stellen eine grundlegende Eigenschaft aller SH2-Domänen ist.

Wie bereits erwähnt besitzen phosphorylierte Wachstumsfaktorrezeptoren mehrere Bindestellen für SH2-Domänen. Durch die systematische Identifizierung der Bindestellen von p85 α , GAP und PLC γ 1 auf dem PDGFr und CSF-1R ist bekannt geworden, dass die zum Phosphotyrosin C-terminale Sequenz die Bindungsspezifität für SH2 reguliert. So haben z.B. die Bindestellen für die p85 Untereinheit der PI3K auf dem Polyomavirus Middle-sized Tumor-Antigen und PDGFr die Konsensussequenz pY-(M/V)-(D/E/P)-(M). Des weiteren können p85 SH2-Domänen mit hoher Affinität an Phosphopeptide der Sequenz pY-M/V-X-M binden [3]. Die Bestimmung der Spezifität der Bindung erfolgt durch „Herausfischen“ von Bindungspartnern aus einer Bibliothek von Phosphopeptiden [4]. Aufgrund ihrer Bindungseigenschaften lassen sich SH2-Domänen in mindestens zwei Kategorien einteilen [5]. Ein Typ bindet hydrophile Reste in Position +1 und +2 zum Phosphotyrosin und einen hydrophoben Rest in Position +3, während ein weiterer Typ generell bevorzugt hydrophobe Reste bindet [4, 5].

Die Vermittlung extrazellulärer Signale über die Plasmamembran an bestimmte intrazelluläre Orte ist ein essentieller Vorgang innerhalb der Zellregulation. Viele Signalwege verändern den Phosphorylierungszustand spe-

zieller Aminosäuren wie Tyrosin, Serin oder Threonin. Es ist seit längerem bekannt, dass Regulationsmechanismen existieren, die gezielt die Aktivität von Proteinkinasen und Phosphatasen in der Zelle beeinflussen. Eines der wichtigsten Proteine in diesem Bereich ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). PI3K besitzt zweifache Enzymaktivität, sowohl als Lipid- als auch als Proteinkinase. Das Molekül ist ein Heterodimer und besteht aus zwei Unterheiten, einer katalytischen Untereinheit von 110 kDa (p110) und einer regulatorischen Untereinheit von 85 kDa (p85). Die p85 Untereinheit besteht aus mehreren Domänen, darunter eine SH3-Domäne, zwei prolinreiche Fragmente sowie zwei SH2-Domänen, die durch eine sog. Inter-SH2-Sequenz (iSH2) getrennt sind (s. Abb. 3). iSH2 vermittelt die Wechselwirkung von p85 mit p110. Während die SH3-Domäne an kurze Aminosäuresequenzen in prolinreichen Sequenzen bindet, binden die SH2-Domänen an spezifische phosphotyrosinenthaltende Motive. Die p85 Untereinheit vermittelt also die Spezifität der Bindung von PI3K an andere Proteine.

Die SH2-Domäne ist eine nichtkatalytische Sequenz aus etwa 100 Aminosäuren. Die Struktur dieses Proteins besteht aus einem zentralen β -Faltblatt, das von zwei α -Helices flankiert wird (s. Abb. 4 [6, 7]). Abb. 5 zeigt die Sequenz des Wildtyps der N-terminalen p85-SH2-Domäne [8].

Die Kristallstrukturen zweier mit einem Peptid komplexierter SH2-Domänen [9], ergaben Informationen über die Wechselwirkung von SH2-Domänen mit Phosphotyrosin und den Positionen +1E, +2E und +3I. Aus diesen Untersuchungen resultiert eine neue Nomenklatur für SH2-Domänen, die auf der Sekundärstruktur aufbaut [7]. Aus den Röntgenstrukturen konnten zwei Bindungstaschen identifiziert werden. Erstens eine Bindestelle für das Phosphotyrosin und zweitens eine hydrophobe Bindestelle für den Rest in Position +3 zum Phosphotyrosin. Beide Taschen sind flexibel, die pTyr-Bindestasche schließt sich bei der Wechselwirkung, während sich die +3-Bindestasche öffnet. Es ist nicht verwunderlich, dass eine Reihe von konservierten Aminosäureresten innerhalb dieser Bindetaschen gefunden werden konnten. Für die Bindung des Phosphotyrosins sind die Reste Arg α A2, Arg β B5 sowie Lys β D6 verantwortlich. Im Gegensatz zur pY-Bindestelle liegt die Bindestelle für +1, +2 und +3 an der Oberfläche des Proteins. Die Position +1 wird von den

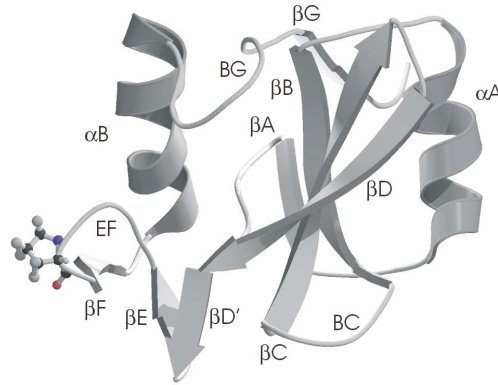


Abbildung 4: Die Lösungsstruktur des Wildtyps der freien N-terminalen p85-SH2-Domäne. Deutlich erkennbar ist das zentrale β -Faltblatt, das von zwei α -Helices flankiert wird. Als Kugelmodell ist die Seitenkette des Prolins 395 gezeigt. Die Bezeichnung der Sekundärstrukturelemente wurde 1993 von Eck et al. eingeführt [7].

Aminosäuren $K\beta D3$ und $I\beta D5$ koordiniert, +2 wird von $K\beta D6$ und $R\beta D'1$ gebunden. Die hydrophobe Bindetasche für die +3-Position wird von der Helix αB , die das Innere der Tasche bildet, und βD sowie den Schleifen EF und BG geformt, welche die Tasche nach außen abschließen. Die Aminosäuren, die an der direkten Wechselwirkung mit der +3-Position beteiligt sind, variieren innerhalb der verschiedenen SH2-Domänen. Bei ihnen handelt es sich um den ausschlaggebenden Faktor, der die Spezifität einer SH2-Domäne zumindest für die +3-Position bestimmt [10].

SH2-Domänen lassen sich entsprechend ihrer Spezifität in verschiedene Gruppen einteilen. Die grundlegende Wechselwirkung zwischen SH2-Domänen und Peptiden soll nun im einzelnen näher betrachtet werden.

Src und Lck SH2-Domänen sind eng miteinander verwandt. Beide binden ein Motiv „pYEEI“. Zwei unpolare nicht-basische Aminosäurereste folgen auf das Phosphotyrosin. In der vierten Position befindet sich ein hydrophober Aminosäurerest. Der Phosphotyrosin- sowie der Isoleucinrest des Phosphopeptids werden von zwei Kavitäten innerhalb der SH2-Domäne gebunden. Beide Glutamatreste des Peptids werden durch die Nähe von basischen Re-

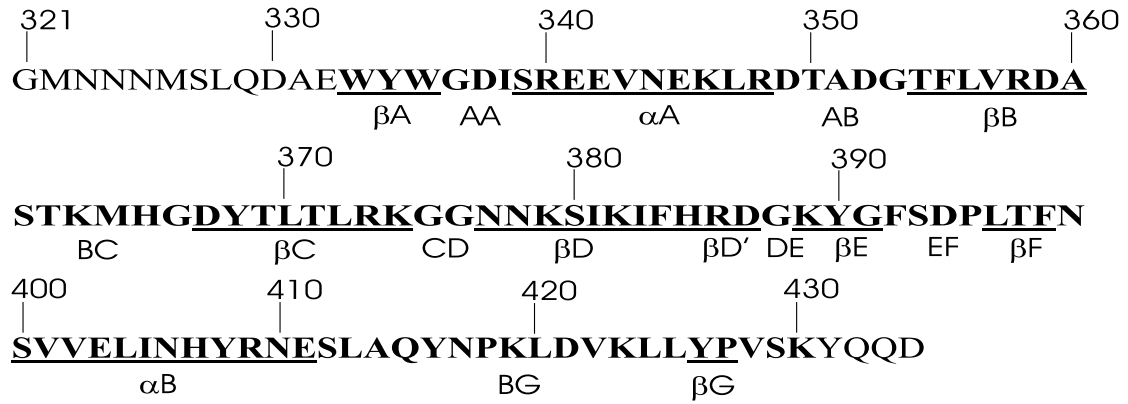


Abbildung 5: Die Sequenz der N-terminalen p85 SH2-Domäne.

sten koordiniert. Die Strukturen von Src und Lck haben gezeigt, dass die Selektivität der Bindung von den drei auf das Phosphotyrosin folgenden Aminosäureresten bestimmt wird. Ähnliche Wechselwirkungen konnten in der C-terminalen SH2-Domäne der Syk Tyrosinkinase und in ZAP-70 SH2-Domänen beobachtet werden.

Die Bindestelle der N-terminalen p85 SH2-Domäne von PI3K für den Isoleucinrest in Position +3 wird von zwei Schleifenregionen (EF und BG) gebildet, die die C-terminale Helix α B flankieren. Die Umgebung dieser Bindestelle unterscheidet sich in verschiedenen SH2-Domänen durch die Art der dort vorkommenden Aminosäurereste. Diese Abweichungen sind wichtig für die unterschiedliche Spezifität der einzelnen SH2-Domänen. Durch Mutation der Aminosäure Thr in Position EF1 in Src zu Trp (EF1 in Grb2) konnte die Spezifität der Src SH2-Domäne so verändert werden, dass sie der Spezifität der Grb2 SH2-Domäne gleicht. Der Rest Tyr β D5 konnte als der wichtigste Rest für die Spezifität der Bindung identifiziert werden. Die p85 und PLC γ SH2-Domänen enthalten hier Ile bzw. Cys. Eine Mutation dieser Aminosäurereste zu Tyr resultierte in einer Selektivität, die der Src SH2-Domäne entspricht [9].

Die N-terminale SH2-Domäne von p85 besitzt eine andere Sequenzspezifität, die Bindung des Peptids erfolgt jedoch auf die gleiche Art wie bei Src und Lck. Wie bereits erwähnt ist PI3K ein Heterodimer aus einer katalyti-

schen Untereinheit (110 kDa) sowie einer regulatorischen Untereinheit (85 kDa). Die Struktur der p85-N SH2-Domäne ähnelt den Strukturen von Src und Lck. Ein Unterschied besteht in einer α -Helix, die der Konsensregion vorgeht. Diese Helix wird für die korrekte Faltung und vollständige Aktivität der Domäne benötigt. Ein Peptid, welches von PDGFr (SIDpYVPMLDMK) abgeleitet wird, sowie ein Peptid des Oncogen cKit (TNEpYMDMKPEV) binden in gestreckter Form ähnlich den pYEEI-Peptiden, die von Src und Lck gebunden werden. Der Methioninrest in Position +3 wird in p85 von der Kavität aufgenommen, die in Src und Lck Ile bindet. Diese Kavität wird von Tyr BG5 in der unkomplexierten Domäne ausgefüllt. Die Seitenkette dieses Aminosäurerestes bewegt sich bei der Bindung des Liganden um 8 Å und ermöglicht dadurch die Bindung des Peptids [9].

1.2 Kernresonanz-Spektroskopie

Die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) stellt neben der Röntgenkristallographie eine weitere Methode zur Untersuchung der dreidimensionalen Struktur von biologischen Makromolekülen auf atomarer Ebene dar. Die NMR hat gegenüber der Röntgenkristallographie den Vorteil, dass die Experimente in wässriger Lösung durchgeführt werden können und somit auch Moleküle, die sich nicht oder nur schwer kristallisieren lassen, untersucht werden können. Der Nachteil der NMR liegt in der relativen Unempfindlichkeit und der Tatsache, dass Proteine nur bis zu einer bestimmten Grösse vermessen werden können. Je grösser ein Molekül ist, umso stärker tritt das Problem der Signalüberlagerung und Verkürzung von Relaxationszeiten auf. Abhilfe gegen Signalüberlagerung wird durch die Verwendung von heteronuklearen, multidimensionalen Experimenten geschaffen. Dazu ist eine möglichst vollständige Anreicherung des Proteins mit den NMR-aktiven Kernen ^{15}N und ^{13}C notwendig. Dies geschieht durch Expression des gewünschten Proteins in Mikroorganismen, die in Medien wachsen, welche $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ und ^{13}C -Glucose enthalten.

1.2.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Viele Atomkerne weisen einen Eigendrehimpuls p , auch Kernspin genannt, auf. Daraus ergibt sich ein magnetisches Moment μ mit

$$\mu = \gamma \cdot p \quad (1.1)$$

wobei das gyromagnetische Verhältnis γ für jede Kernart eine charakteristische Größe darstellt. Aus der Quantenmechanik folgt eine Quantelung von Bahndrehimpuls und Spin mit

$$p = \sqrt{I(I+1)} \cdot \frac{h}{2\pi} \quad (1.2)$$

und

$$\mu = \gamma \cdot \sqrt{I(I+1)} \cdot \frac{h}{2\pi} \quad (1.3)$$

I ist hierbei die Kerndrehimpulsquantenzahl. Diese Zahl kann ganz- oder halbzahlige Werte annehmen. Bringt man eine Probe in ein homogenes, statisches Magnetfeld, so richtet sich der Drehimpulsvektor P in bestimmten gequantelten Winkeln zum Magnetfeld aus. Für den Eigendrehimpuls p in Feldrichtung gilt hierbei

$$p_B = m \cdot \frac{h}{2\pi} \quad (1.4)$$

Die magnetische Quantenzahl kann hierbei Werte von

$$m = +I, I-1, I-2, \dots, -I+1, -I \quad (1.5)$$

annehmen. Die Energie dieser insgesamt $(2I+1)$ Eigenzustände ist

$$E_m = -\mu_B \cdot B_0 = -\gamma \cdot p_B \cdot B_0 \quad (1.6)$$

$$= -\gamma \cdot m \cdot \frac{h}{2\pi} \cdot B_0 \quad (1.7)$$

mit

$$m = +I, \dots, -I \quad (1.8)$$

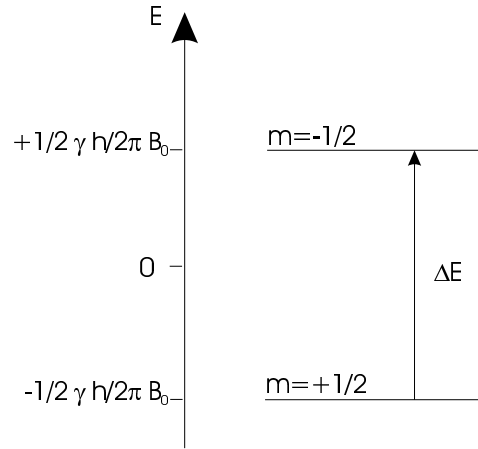


Abbildung 6: Energieniveaus von Kernen mit $m = \pm 1/2$ in einem äußeren Magnetfeld B_0 .

Für das Wasserstoffatom z.B. ist $I = 1/2$ und somit $m = \pm 1/2$.

Abb. 6 zeigt das Energieniveauschema von Protonen in einem Magnetfeld B_0 . Im energetisch niedrigeren Zustand rotiert das magnetische Moment μ mit der Frequenz $\nu_0 = |\gamma| \cdot \frac{B_0}{2\pi}$ um das Magnetfeld B_0 , auf dem energetisch höheren Niveau entsprechend mit $-B_0$. Befinden sich die Kerne in einem thermischen Gleichgewicht, so ergibt sich für ihren Energieinhalt eine Boltzmann-Verteilung. Es gilt:

$$\Delta E = \gamma \cdot \frac{h}{2\pi} B_0 \quad (1.9)$$

Das Verhältnis der Besetzungszahlen der beiden Energiezustände ist:

$$\frac{N_{(m=-1/2)}}{N_{(m=+1/2)}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (1.10)$$

Als Resonanzbedingung für eingestrahlte Energiequanten ΔE erhält man:

$$h\nu = \Delta E = \gamma \frac{h}{2\pi} \cdot B_0 \quad (1.11)$$

Der Übergang vom energieärmeren in den energiereicheren Zustand geschieht durch Absorption. Beim entgegengesetzten Übergang vom energetisch

höheren auf das energetisch niedrigere Niveau wird Energie frei, die in Form von Wärme abgegeben werden kann. Diesen Vorgang bezeichnet man als Relaxation. Unterschieden wird hierbei zum einen die Spin-Gitter-Relaxation, bei der die freiwerdende Energie an die Umgebung abgegeben wird. Dies geschieht mit $1/T_1$, wobei T_1 als longitudinale Relaxationszeit bezeichnet wird. Die Magnetisierung der Kerne ändert sich in Feldrichtung. Zum anderen kann durch Wechselwirkung der Kernmomente untereinander die Magnetisierung in transversaler Richtung geändert werden. Man spricht dann von Spin-Spin-Relaxation, hierfür gilt die transversale Relaxationszeit T_2 .

Charakteristische Informationen aus kernmagnetischen Resonanzspektren sind die Lage oder Resonanzfrequenz, Linienbreite und Intensität der einzelnen Signale. Bei welcher Frequenz ein bestimmtes Atom in Resonanz gerät, hängt von seiner Umgebung ab. Am Kernort herrscht die effektive Feldstärke B_{eff} , die sich durch das induzierte Feld σB_0 vom äußeren Magnetfeld B_0 unterscheidet.

$$B_{eff} = B_0 - \sigma B_0 \quad (1.12)$$

σ stellt dabei die sogenannte Abschirmungskonstante dar. Diese dimensionslose Größe geht in die Resonanzbedingung wie folgt ein.

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 (1 - \sigma) \quad (1.13)$$

Je größer die Abschirmungskonstante eines Kernels ist, desto kleiner wird das effektive Magnetfeld. Um einen Kern bei hoher Abschirmung dennoch in Resonanz zu bringen, muß das angelegte Magnetfeld B_0 entsprechend größer sein. Da es sich bei ν um eine Funktion von B_0 handelt, läßt sich keine absolute Skala für ν oder B_0 angeben. Verwendet werden daher die Signallage einer Referenzverbindung zur Bestimmung der Lage gemessener Signale. Eine solch typische Referenzverbindung ist Tetramethylsilan (TMS). Die Signallage bezeichnet man auch als chemische Verschiebung δ . Die chemische Verschiebung eines Kernels X ist definiert als:

$$\delta_X = 10^6 \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}}, \quad \delta(TMS) = 0 \quad (1.14)$$

Die chemische Verschiebung ist charakteristisch für einen Kern in Abhängigkeit von seiner Umgebung. Es handelt sich um eine dimensionslose Größe, die nicht von der angelegten Magnetfeldstärke oder der Meßfrequenz abhängt. Der Faktor 10^6 ist eingeführt worden, da $\Delta\nu$ gegenüber ν sehr klein ist. δ wird deshalb in ppm angegeben. Typische Resonanzen liegen für Protonen im Bereich von -1 - 12 ppm, für ^{13}C -Atome im Bereich von 10 bis 200 ppm.

Die typische Linienform eines NMR-Signals ist eine Lorentzkurve. Die Linienbreite b , gemessen auf halber Höhe eines Signals, ist abhängig von Feldinhomogenitäten, Fernkopplungen sowie den Relaxationszeiten T_1 und T_2 . Verkleinern sich z.B. die Relaxationszeiten, etwa durch Anwesenheit paramagnetischer Verbindungen oder Erhöhung der Viskosität der Meßlösung, kommt es zu einer Linienverbreiterung. Ebenso können intra- und intermolekulare Austauschphänomene eine Ursache für eine Linienverbreiterung sein.

Die Intensität eines NMR-Signals erlaubt eine Aussage über die Anzahl der Kerne, die an einer bestimmten Stelle des Spektrums absorbieren. Zur Bestimmung der Intensität wird die Fläche unter der Absorptionskurve eines Signals integriert und als Stufenkurve dargestellt [11].

1.3 Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie

Bei der Aufklärung der Struktur von Proteinen ergeben sich aufgrund des Molekulargewichtes zwei Probleme für die NMR-Spektroskopie. Zum einen steigt die Überlagerung von Signalen durch die steigende Anzahl von Aminosäuren, zum anderen ergibt sich mit zunehmender Größe der Moleküle eine Linienverbreiterung. Um diesen Effekten entgegen zu wirken, ist die mehrdimensionale NMR-Spektroskopie entwickelt worden. Nach der Entwicklung der Fouriertransformations-NMR durch Anderson und Ernst [12] und der Einführung einer zweiten Frequenzdimension durch Jeener [13] ist eine Vielzahl von Experimenten auf dieser zweidimensionalen Basis entwickelt worden [14] und es ist möglich geworden, komplexe Moleküle wie Zucker, synthetische Polymere und Peptide zu untersuchen. Zu Beginn der 80er Jahre gewinnt die NMR zur Aufklärung von Proteinstrukturen an Bedeutung,

nachdem neue systematische Methoden zur Verfügung stehen [15]. Als weiterer Meilenstein der NMR-Entwicklung ist die Einführung der dritten Frequenzdimension zu sehen. Da die 3D-Experimente den 2D-Experimenten vom prinzipiellen Aufbau sehr ähnlich sind, werden keine neuen Formalismen für die Beschreibung dieser Experimente benötigt. Das Hauptproblem, das sich aus den 3D-Experimenten ergibt, ist das enorme Datenaufkommen, das es aufzuzeichnen und zu prozessieren gilt. Die Anreicherung von Proteinproben mit den Isotopen ^{13}C und ^{15}N ist ein weiterer Schritt in dreidimensionaler NMR [16]. Durch rekombinante Expression ist es möglich, gezielt Proteine in Mikroorganismen produzieren zu lassen, die mit diesen NMR-aktiven Kernen angereichert sind und so das Problem der geringen Empfindlichkeit zu lösen.

Die Grundlage der meisten mehrdimensionalen Experimente stellt eine Korrelation der chemischen Verschiebungen bestimmter Kerne aufgrund von Wechselwirkungen zwischen diesen Kernen dar. So ist z.B. bei einem 2D NOESY-Experiment die chemische Verschiebung der Protonen über eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung korreliert, die dazu führt, dass es zu einem Magnetisierungstransfer durch den Kern-Overhauser-Effekt kommt. Auf die Protonen werden drei Radiofrequenzpulse angewandt. Diese Sequenz wird in inkrementierten Zeitdauern mit der Länge t_1 wiederholt. Die Signale, die während der Phase t_2 detektiert werden, sind durch die während t_1 anwesenden Frequenzen moduliert. Durch zwei Fourier-Transformationen in beide Dimensionen der aufgenommenen Daten wird ein zweidimensionales NMR-Spektrum erhalten.

In einem NOESY-Spektrum können Korrelationen in Proteinen zwischen den Resonanzfrequenzen zweier Atome nur dann auftreten, wenn sich diese beiden Atome räumlich näher als etwa 6 Å sind. Diese Information erlaubt Aussagen über die räumliche Struktur eines Proteins. Bevor jedoch diese Information nutzbar ist, ist es notwendig, jedem Proton innerhalb eines Proteins eine Resonanzfrequenz zuzuordnen, durch die es eindeutig charakterisiert wird. Dies erfolgt durch sogenannte J-korrelierte Experimente. In diesen Experimenten wird die Magnetisierung zwischen chemisch miteinander verbundenen Atomen entlang chemischer Bindungen durch den Kopplungsmechanismus übertragen. Das bekannteste dieser Experimente ist das COSY,

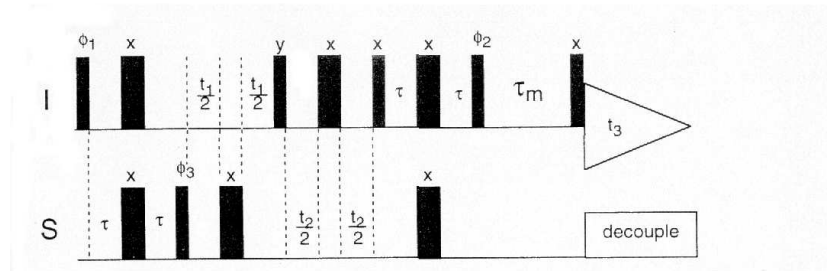


Abbildung 7: Die Pulssequenz des zweidimensionalen ^{15}N -HSQC-Experimentes [16].

in welchem die Magnetisierung von einem Proton auf ein anderes über ^1H - ^1H -Kopplung übertragen wird. Voraussetzung für dieses Experiment ist, dass J_{HH} nicht wesentlich kleiner als die Linienbreite der ^1H -Resonanzlinie ist. Da die Linienbreite etwa linear mit der Größe des Proteins zunimmt, gelangen größere Moleküle in einen Bereich, in dem die ^1H - ^1H -Kopplung kleiner als die Linienbreite wird und somit das COSY-Experiment nicht mehr effektiv anwendbar ist.

Abb. 7 beschreibt eine Pulssequenz, bei der die Frequenz eines Protons mit der Frequenz eines direkt daran gebundenen Heteroatoms, ^{13}C oder ^{15}N (hier ^{15}N), korreliert wird. Die heteronuklearen Kopplungskonstanten über eine Bindung betragen für $^1J_{CH}$ 125-160 Hz und für $^1J_{NH}$ etwa 92 Hz. Da diese Kopplungen deutlich größer sind als reine Protonenkopplungen und sich die Magnetisierung von einem Proton auf ein Heteroatom übertragen lassen, sind diese heteronuklearen Korrelationen deutlich empfindlicher.

Wenn die beiden Pulssequenzen miteinander verknüpft werden, entsteht leicht ein dreidimensionales Experiment [16]. Radiofrequenzpulse werden als vertikale Balken dargestellt. Die typische Zeitdauer dieser Pulse liegt im Bereich von einigen Mikro- oder Millisekunden. Die Aufnahme der Signale erfolgt nun für viele verschiedene Zeiten t_1 (und t_2) während t_2 . Die aufgenommenen Protonensignale werden durch in der Nähe befindliche Protonen (in t_1) sowie durch den direkt gebundenen ^{15}N -Kern (in t_2) beeinflusst. Nach einer Fourier-Transformation entsteht ein 3D NMR-Spektrum. Üblicherwei-

se sind diese Spektren als Folge von benachbarten Querschnitten durch die dreidimensionalen Daten dargestellt.

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung der Proteinproben

Die Herstellung der Proteinproben sowie der Ligandpeptide erfolgt an der School of Medicine der Tufts University Boston [8]. Die Reinheit der phosphorylierten Peptide ist durch HPLC und Massenspektrometrie bestätigt worden. Die Expression der mit ^{15}N und ^{13}C angereicherten p85-N SH2-Proben erfolgt wie in [8, 17] beschrieben in *E. coli* als ein pGEX 3X-Glutathion S-Transferase Fusionsprotein aus 1 l CELTONE-CN (MARTEK Biosciences Corporation). Die Proteinproben werden anschließend durch Gelchromatographie gereinigt. Die Konzentration der SH2-Proben beträgt 1.5 mM.

3 NMR-Methoden

3.1 Pulssequenzen für die sequentielle Zuordnung

Die hier beschriebenen Experimente werden an einem AMX499 MHz-, einem DMX 600MHz- sowie einem DMX800MHz-NMR-Spektrometer der Firma Bruker Analytische Messtechnik GmbH bei 303 K in 90% H_2O /10% D_2O durchgeführt.

3.1.1 HNCA-Experiment

Das HNCA-Experiment stellt einen Prototypen aller Tripelresonanzexperimente dar [18]. Hierbei wird die Magnetisierung ausgehend von einem Amidproton auf den Amidstickstoff übertragen. Anschließend wird die Magnetisierung auf das α -Kohlenstoffatom übertragen, dieses wird als zweite Dimension gemessen. Abschließend erfolgt ein Magnetisierungstransfer zurück zum Amidproton, das in der dritten Dimension gemessen wird. Das HNCA-Experiment korreliert die chemischen Verschiebungen der ^1H - und ^{15}N -Atome eines Aminosäurerestes mit der chemischen Verschiebung des intraresidualen oder eines interresidualen $^{13}\text{C}^\alpha$ -Atoms über starke ^1J -Kopplungen. Zusätzlich entsteht eine Verbindung zum interresidualen $^{13}\text{C}^\alpha$ -Atom des vorangehenden

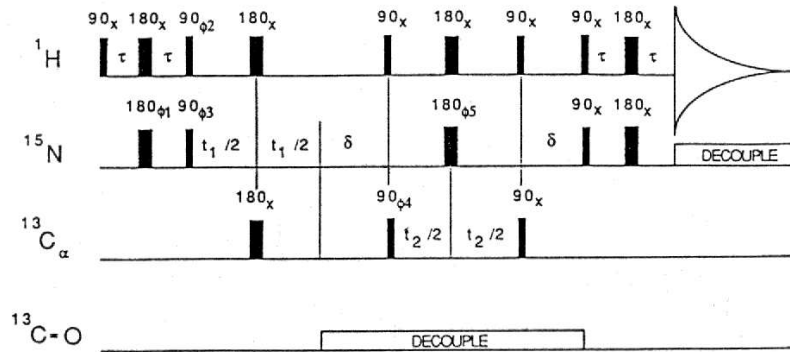


Abbildung 8: Die Pulssequenz eines 3D-HNCA-Experimentes [18]. Die Verzögerung δ wird so gewählt, daß sie einem Vielfachen von $1/J_{NH}$ entspricht und maximalen Magnetisierungstransfer zwischen den spins von C^α und ^{15}N erlaubt. Typische Zeitdauern sind $\delta = 33ms$ und $\tau = 2,25ms$.

Aminosäurerestes über eine 2J -Kopplung von ~ 7 Hz wie in Abb. 9 zu sehen ist. Die Pulssequenz des HNCA-Experimentes ist in Abb. 8 dargestellt. Die Magnetisierung wird von einem Amidproton durch eine INEPT-Sequenz [19] auf den Amidstickstoff übertragen. Die chemische Verschiebung des ^{15}N entwickelt sich während der Zeit t_1 , $^{13}C^\alpha$ und 1H sind durch einen Puls von 180° in der Mitte von t_1 entkoppelt. Während einer darauffolgenden Verzögerung erfährt die Magnetisierung von ^{15}N eine Phasenumkehr gegenüber den angeschlossenen $^{13}C^\alpha$ -Kernspins. Um Relaxationsverluste zu minimieren und gleichzeitig den Transfer über die ^{15}N - $^{13}C^\alpha$ -Kopplung zu optimieren, wird diese Verzögerung auf $\frac{1}{(3J_{NC^\alpha})}$ gesetzt. Nachfolgend wird ein Puls von 90° sowohl auf 1H als auch auf $^{13}C^\alpha$ angewandt, um so eine Kohärenz der drei Kernspins H^N - ^{15}N - $^{13}C^\alpha$ zu erzeugen. Während t_2 soll sich nur die chemische Verschiebung von $^{13}C^\alpha$ entwickeln. Um dies zu gewährleisten, werden die chemischen Verschiebungen von 1H und ^{15}N refokussiert. Dies geschieht durch Anwendung zweier 180° -Pulse auf 1H und ^{15}N in der Mitte der t_2 -Periode.

3.1.2 HN(CO)CA-Experiment

Das HN(CO)CA-Experiment [20] verbindet die chemischen Verschiebungen von H^N und ^{15}N eines Aminosäurerestes i mit der chemischen Verschiebung

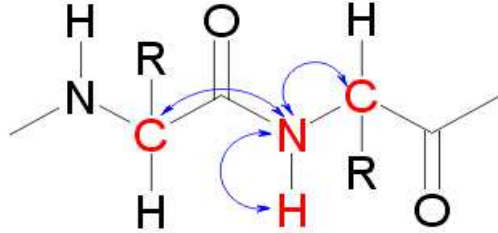


Abbildung 9: Die Korrelation der chemischen Verschiebungen im HNCA-Experiment. Durch einen Magnetisierungstransfer beginnend beim Amidproton des Aminosäurerestes i zum Amidstickstoff und anschließend zum α -Kohlenstoff entsteht eine sequentielle Verbindung zum Aminosäurerest i-1.

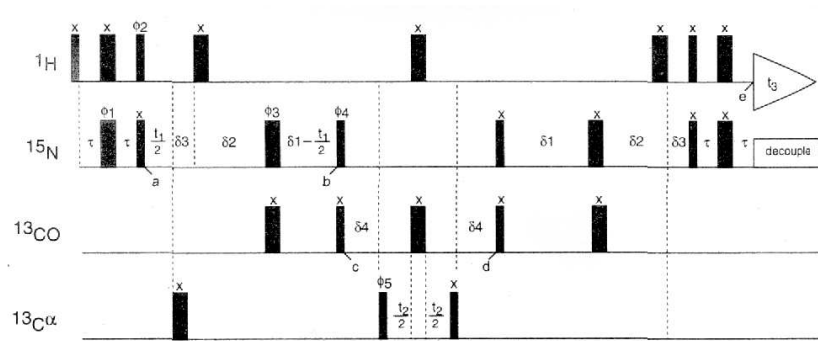


Abbildung 10: Die Pulssequenz eines 3D-HN(CO)CA-Experimentes [16].

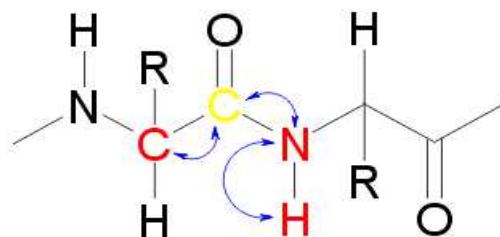


Abbildung 11: Die Korrelation der chemischen Verschiebungen des HN(CO)CA-Experimentes. Durch einen Magnetisierungstransfer beginnend beim Amidproton des Aminosäurerestes *i* zum Amidstickstoff und einen anschließenden Kohärenztransfer über den Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung zum α -Kohlenstoff entsteht eine sequentielle Verbindung zum Aminosäurerest *i*-1.

von $^{13}\text{C}^\alpha$ des vorhergehenden Restes *i*-1 durch Kohärenztransfer über das dazwischenliegende ^{13}CO (s. Abb. 11). Im Gegensatz zum HNCA-Experiment, das nicht zwischen intraresidualen und interresidualen Verbindungen unterscheiden kann, da die Kopplungen von $^1J_{\text{C}^\alpha\text{N}}$ und $^2J_{\text{C}^\alpha\text{N}}$ vergleichbar gross sind, liefert das HN(CO)CA-Experiment ausschließlich sequentielle Informationen. In Abb. 10 ist die Pulssequenz für ein HN(CO)CA-Experiment dargestellt. Die Kombination aus HNCA und HN(CO)CA liefert alle nötigen Informationen, um die Aminosäuresequenz eines Proteinrückgrates vollständig zuordnen zu können.

3.2 Pulssequenzen für die Seitenkettenuordnung

Zur Zuordnung der Seitenketten werden je ein 3D-TOCSY- $(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ -HSQC-, ein (H)C(CO)NH-, ein HCCH-TOCSY- sowie ein C(CO)NH-Experiment [21] an einer mit ^{13}C und ^{15}N doppelt markierten Proteinprobe der Konzentration 1.5 mM aufgenommen. Die Experimente werden bei 33 °C an einem DMX 499- und einem DMX 600-Gerät der Firma Bruker Analytische Messtechnik GmbH durchgeführt.

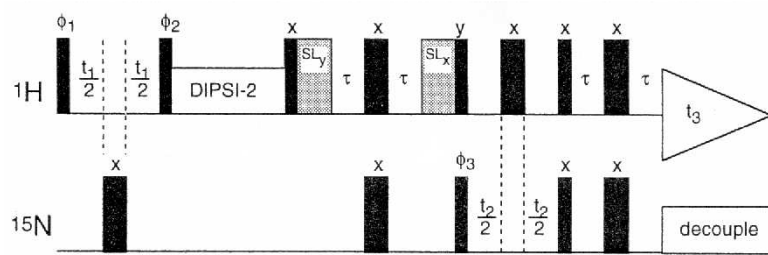


Abbildung 12: Die Pulssequenz eines 3D-TOCSY-(^{15}N , ^1H)-HSQC-Experimentes [16].

3.2.1 3D-TOCSY-(^{15}N , ^1H)-HSQC-Experiment

Das 3D-TOCSY-(^{15}N , ^1H)-HSQC-Experiment korreliert die chemische Verschiebung des Amidprotons eines Aminosäurerestes i mit den chemischen Verschiebungen der Seitenkettenprotonen des Restes i [22–26]. In Abb. 12 ist die Pulssequenz des Experimentes dargestellt. Während der Evolutionszeit t_1 entwickelt sich die chemische Verschiebung der Protonen. Die transversale Protonenmagnetisierung wird durch den sich anschließenden Gradientenpuls dephasiert. Die chemische Verschiebung der Amidprotonen entwickelt sich während t_2 . Durch einen INEPT-Schritt [19] wird beobachtbare Magnetisierung erzeugt, die auf die Amidprotonen übertragen aufgenommen wird.

3.2.2 (H)C(CO)NH-Experiment

Das (H)C(CO)NH-Experiment [21] korreliert die ^{13}C -Resonanzen von aliphatischen Aminosäureseitenketten direkt mit der Resonanz des Amidprotons der in der Proteinsequenz darauffolgenden Aminosäure. Abb. 13 zeigt die Pulssequenz für ein solches Experiment. Als erstes wird durch einen INEPT-Transfer die Spinnmagnetisierung der aliphatischen Kohlenstoffatome verstärkt. Die chemische Verschiebung der aliphatischen Kohlenstoffatome entwickelt sich während der Evolutionszeit t_1 . Der Magnetisierungstransfer entlang der aliphatischen Seitenkette wird durch einen TOCSY-Transfer gewährleistet. Die chemische Verschiebung der Amidprotonen sowie deren Kopplung mit den Seitenkettenkohlenstoffatomen entwickelt sich während

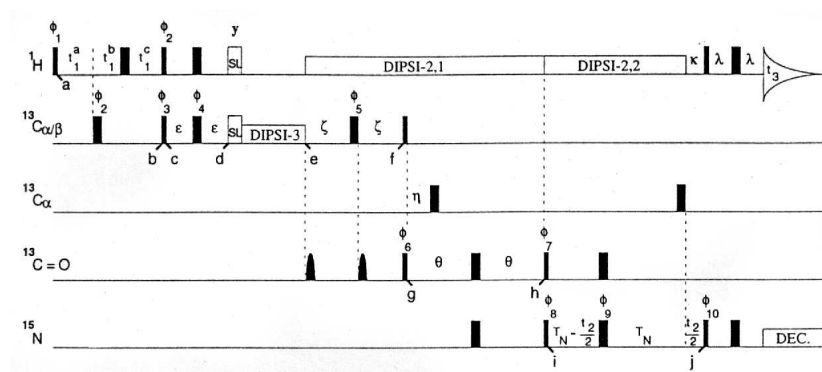


Abbildung 13: Die Pulssequenz eines (H)C(CO)NH-Experimentes [21].

t_2 . Durch einen INEPT-Schritt mit Empfindlichkeitsverstärkung (*sensitivity enhancement*) [19] wird beobachtbare Magnetisierung erzeugt, die auf die Amidprotonen übertragen aufgenommen wird.

3.2.3 3D-HCCH-TOCSY-Experiment

Das 3D-HCCH-TOCSY-Experiment [27] verwendet die Kopplungen $^1J_{HC}$ (140 Hz) und $^1J_{CC}$ (30-40 Hz) zur Ableitung vollständiger Spinsysteme der ^{13}C -Atome und den zu ihnen gehörenden Protonen. Die Pulssequenz für dieses Experiment ist in Abb. 14 dargestellt. Nach der Evolutionszeit t_1 , während der sich die chemischen Verschiebungen der Protonen sowie die $^3J_{HH}$ - und $^1J_{HC}$ -Kopplungen entwickeln, wird die Magnetisierung durch einen 90° -Puls über $^1J_{HC}$ von den Seitenkettenprotonen auf die direkt an sie gebundenen Kohlenstoffatome übertragen. Die Signale der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome werden durch einen TOCSY-Transfer miteinander verbunden. Die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffkerne sowie die Kopplungen zwischen ^{13}C und ^1H entwickeln sich während t_2 . Über einen reversen INEPT-Schritt [19, 28] wird beobachtbare Magnetisierung erzeugt, die auf die Amidprotonen übertragen aufgenommen wird.

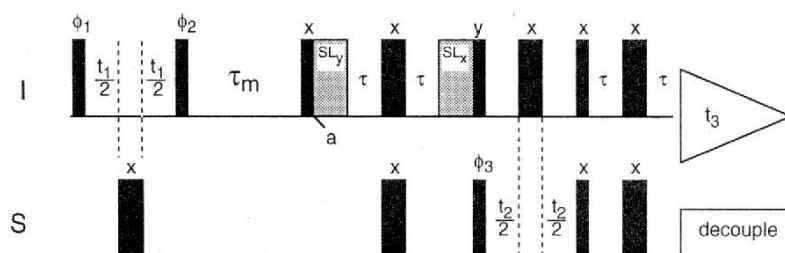


Abbildung 15: Die Pulssequenz eines 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC-Experimentes [16].

selwirkungen zu räumlich benachbarten Aminosäuren. Die Signalintensität nimmt auch hierbei mit $\frac{1}{r^6}$ ab [22–26].

Die chemische Verschiebung der aliphatischen Seitenkettenprotonen entwickelt sich während der Wartezeit t_1 . Hierbei werden die heteronuklearen Kerne durch 180° -Pulse entkoppelt. Die restliche transversale Magnetisierung wird dephasiert. Zur Übertragung der Magnetisierung auf die ^{13}C -Kerne wird anschließend ein 90° -Puls ausgeführt. Die chemische Verschiebung der ^{13}C -Kerne entwickelt sich während der Wartezeit t_2 . Über einen reversen INEPT-Schritt [19, 28] wird beobachtbare Magnetisierung erzeugt, die auf die Protonen übertragen aufgenommen wird.

3.4 Prozessierung und Referenzierung der Spektren

3.4.1 Prozessierung

Die Prozessierung der NMR-Spektren ist mit dem Programm UXNMR 2.5 der Fa. Bruker durchgeführt worden. Vor der Fourier-Transformation werden die Daten einem *zero-filling* auf die nächste Potenz von 2, einer Konvolution mit einer quadratischen Sinusfunktion sowie im Falle von dreidimensionalen Spektren einer „*linear prediction*“ unterzogen. Im Anschluss an die Fourier-Transformation wird eine Phasenkorrektur und eine Basislinienkorrektur in der ersten Domäne durchgeführt, um das Signal des Wassers zu unterdrücken.

3.4.2 Referenzierung

Die Referenzierung erfolgt wie durch Wishart et al. beschrieben unter Berücksichtigung der Temperatur auf die Signale der chemischen Verschiebung der Atomkerne [29].

$$ref(^1H) = 4.766 - (\Delta T \cdot 0.0119), \quad \Delta T = T_{Mess} - 298.3K \quad (3.1)$$

$$ref(^{15}N) = \frac{(SFO3 \cdot 1000000 - N_0)}{SFO3},$$

$$N_0 = (SFO1 \cdot 1000000 (ref(^1H) \cdot SFO1)) \cdot 0.101329115 \quad (3.2)$$

$$ref(^{13}C) = \frac{(SFO2 \cdot 1000000 - C_0)}{SFO2},$$

$$C_0 = (SFO1 \cdot 1000000 (ref(^1H) \cdot SFO1)) \cdot 0.251449525 \quad (3.3)$$

SFO1: Frequenz der ersten Dimension, SFO2: Frequenz der zweiten Dimension, SFO3: Frequenz der dritten Dimension, T_{Mess} : Temperatur, bei der das Spektrum aufgenommen wird.

3.5 Strukturbestimmung von Proteinen

Das Schema in Abb. 16 verdeutlicht die in der vorliegenden Arbeit verwendete Vorgehensweise zur Ermittlung der Proteinstrukturen.

Als Grundlage der Strukturrechnung dienen die chemischen Verschiebungen der zugeordneten Atome des Proteins, die chemischen Verschiebungen der NOE-Kreuzsignale sowie eine Startstruktur. Als Startstruktur wird hier die Lösungsstruktur des Wildtyps der N-terminalen SH2-Domäne verwendet [6]. Aus diesen Informationen wird mit Hilfe des Programms NMR2S eine Liste von Abstandsbeschränkungen generiert. Diese Abstandsbeschränkungen gehen zusammen mit Torsionswinkelvorschlägen aus dem Programm TALOS direkt in eine Strukturrechnung mit dem Programm DYANA ein. Für die von DYANA berechneten Strukturen schließt sich nun ein Auswahlverfahren an. Wenn die Struktur noch verletzte Abstandsbeschränkungen enthält, so werden diese entfernt und eine erneute Strukturrechnung durchgeführt bis keine verletzten Abstandsbeschränkungen mehr vorhanden sind. Wenn

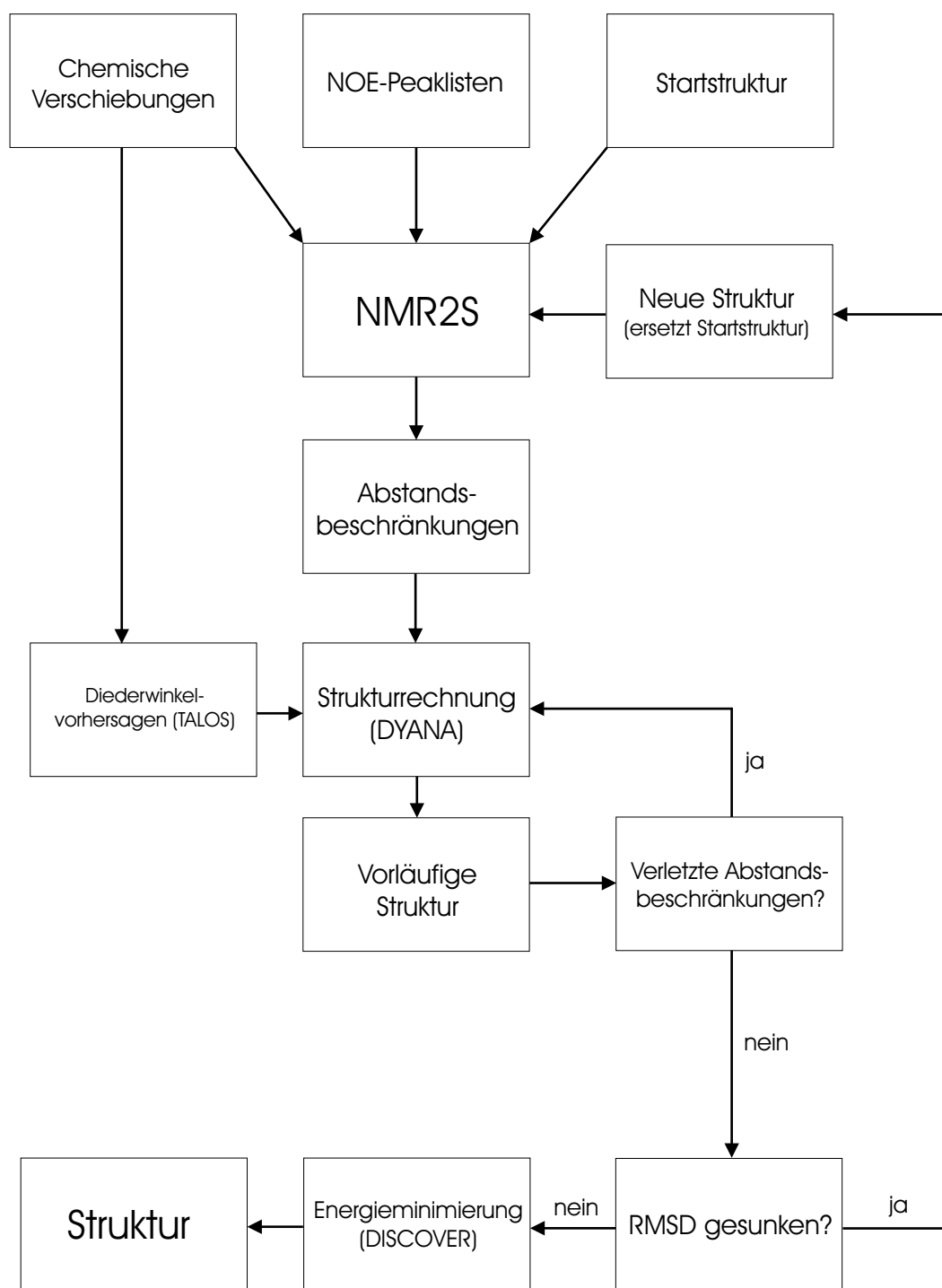


Abbildung 16: Fließschema der Strategie zur Ermittlung von Proteinstrukturen.

der RMSD des aktuell berechneten Strukturbündels niedriger ist als der des vorhergehenden, so wird die berechnete Struktur als neue Startstruktur zur Generierung neuer Abstandsbeschränkungen herangezogen. Ist der RMSD nicht geringer, so schließt sich an die Strukturrechnung eine Energieminimierung an und der Vorgang wird beendet. Im folgenden sollen nun die einzelnen Teilschritte näher betrachtet werden.

3.5.1 Halbautomatische NOE-Zuordnung mit NMR2S

Die Zuordnung der NOE-Kreuzsignale erfolgt mit Hilfe des Programmes NMR2S [30]. Dieses Programm vergleicht die chemischen Verschiebungen innerhalb einer Peakliste eines zwei- oder dreidimensionalen NOESY-Spektrums mit den chemischen Verschiebungen aller zugeordneten Atome eines Proteins und ermöglicht auf diese Weise die Zuordnung von NOE-Kreuzsignalen. Als Grundlage für die Zuordnung verwendet NMR2S eine Startstruktur. Mit Hilfe dieser Struktur werden räumlich benachbarte Aminosäuren identifiziert, um so von vornherein aufgrund ihrer Entfernung nicht mögliche Zuordnungen auszuschließen. Es existieren mehrere Parameter innerhalb des Algorithmus, die sicherstellen, dass Veränderungen der neu zu berechnenden Struktur nicht durch die Vorgabe der Startstruktur unterdrückt werden. Diese Parameter werden beim Aufruf des Programmes über die Kommandozeile an den Algorithmus übergeben. Als erstes wird hierbei die Startstruktur eingegeben. Die Liste der NOE-Signale wird als Textdatei mit Hilfe der Parameter *noe* sowie *ppm1*, *ppm2*, und *ppm3* an das Programm übergeben. Diese drei Parameter identifizieren die Dimensionen der chemischen Verschiebungen innerhalb der Datei. Zusätzlich wird hierbei angegeben, ob es sich um eine ^{15}N - oder ^{13}C -Peakliste handelt. Die Toleranzen des Suchalgorithmus in Bezug auf die 1. und 2. Dimension der chemischen Verschiebungen wird durch den Parameter *tol* bestimmt. Der voreingestellte Wert beträgt 0.02 ppm. Die Toleranz der chemischen Verschiebung des Heteroatoms wird durch den Parameter *xtol* vorgegeben. Hier beträgt der voreingestellte Wert 0.3 ppm. Um aus den NOE-Signalen Abstandsinformationen zu erhalten, müssen die Volumina der einzelnen Signale innerhalb der Peaklisten zunächst auf einen Abstand ka-

libriert werden. Die Kalibrierung erfolgt über den Parameter *calib*. Hierzu wird ein beliebiges Signal bekannten Abstands als Kalibrierungspeak verwendet, auf dessen Volumen alle weiteren Signale kalibriert werden. Eine stereospezifische Zuordnung der NOE-Signale wird über den Parameter *stereo* erzwungen. Die NOE-Signale werden in schwach, mittelstark und stark unterteilt. Die maximalen Abstände in Å für diese drei Kategorien an Signalen werden durch den Parameter *limits* bestimmt. Hier sind als Abstände für schwache Signale 2.5 Å, für mittelstarke Signale 3.0 Å sowie für starke Signale 4.0 Å voreingestellt. Ein wichtiger Parameter ist der maximale Abstand *r* eines zugeordneten Signales innerhalb der Startstruktur. Hier werden zwei Abstandsgrenzen angegeben, die als Suchradien dienen. Die erste Abstandsgrenze wird durch *radius1* (Voreinstellung 5 Å) definiert. Wird innerhalb dieses ersten Suchradius keine Zuordnung für ein Signal gefunden, so wird der Suchradius um *radius2* erweitert und anschließend in diesem neuen Radius gesucht. Sollten mehr als eine Zuordnung für ein Signal gefunden werden, kann die Qualität dieser Zuordnung durch drei weitere Parameter beeinflusst werden. Diese Parameter sind *sdist* (in Å), *ddist* (in Å) und *dppm* (in ppm). Eine Zuordnung innerhalb des erweiterten Suchradius wird nur dann akzeptiert, wenn eine mögliche weitere Zuordnung des gleichen Signals weiter als der für *sdist* gesetzte Wert entfernt ist. Eine mögliche weitere Zuordnung wird erlaubt, wenn diese neue Zuordnung sich um nicht mehr als den durch *ddist* bestimmten Wert von der besten Zuordnung unterscheidet. Ebenso wird eine mögliche weitere Zuordnung zugelassen, wenn die chemische Verschiebung der neuen Zuordnung um nicht mehr als *dppm* ppm von der besten Zuordnung abweicht. Eine Zusammenfassung aller dieser Parameter findet sich in den folgenden Tabellen.

Startstruktur.car/.mdf	Eingabe der Dateien für die Startstruktur.
-noe Peakliste ppm1 ppm2 ppm3 Volumen N/C	Eingabe der NOE-Peakliste. Die Datei muss im Textformat vorliegen. ppm1: Spalte 1. Dimension der chem. Verschiebungen, ppm2: Spalte 2. Dimension der chem. Verschiebungen, ppm3: Spalte 3. Dimension der chem. Verschiebungen, Volumen: Spalte Peakvolumen, N oder C gibt an, ob sich um eine ^{15}N - oder eine ^{13}C -Peakliste handelt.
-tol dim1 dim2	Toleranzwert in ppm für die 1. und 2. Dimension der chem. Verschiebungen, Voreinstellung: 0,02 ppm.
-xtol hetdim	Toleranzwert für die chem. Verschiebungen des Heteroatoms, Voreinstellung: 0,3 ppm.
-calib nr_calib1 nr_calib2 calib-dist	Kalibrierung der Abstände, nr_calib1: Zeile des Kalibrierungspeaks innerhalb der Peakliste, nr_calib2: Anzahl der Kalibrierungspeaks, calib-dist: Abstand in Å, auf den das Volumen des Peaks kalibriert wird.
-ppm Chemische Verschiebungen	Eingabe der Datei mit den chemischen Verschiebungen der Atome.
-stereo	Dieser Parameter erzwingt eine stereospezifische Zuordnung der NOE-Signale.
-limits stark mittel schwach	Max. Abstände in Å für starke, mittelstarke und schwache NOE-Signale, Voreinstellung: 2.5 3.0 4.0
-r radius1 radius2	Max. Abstand eines zugeordneten Abstandes in Å innerhalb der Startstruktur, radius1: Erste Abstandsgrenze, Voreinstellung: 5 Å, radius2: Sollte innerhalb von radius1 keine Zuordnung gefunden werden, so wird radius2 zu radius1 addiert und innerhalb dieses neuen Abstandes gesucht.
-sdist Abstand	Abstand in Å, eine Zuordnung innerhalb des radius2 wird nur dann angenommen, wenn eine mögliche zweite Zuordnung des gleichen Signals weiter als der für sdist gesetzte Wert entfernt ist.

Tabelle 2: Liste der Parameter des Programmes NMR2S.

-ddist Abstand	Eine mögliche weitere Zuordnung wird erlaubt, wenn die neue Zuordnung nicht schlechter als ddist in Å im Vergleich zur besten Zuordnung ist.
-dppm Toleranz	Eine mögliche weitere Zuordnung wird erlaubt, wenn die chemische Verschiebung der neuen Zuordnung nicht mehr als dppm in ppm von der besten Zuordnung entfernt ist.
-wr Ausgabedatei Protokolldatei	Ausgabe der erstellten Abstandsbeschränkungen in eine Datei. Die Meldungen des Programmes werden in der Protokolldatei ausgegeben.
-vdw	Dieser Parameter erzwingt die Einhaltung von Van-der Waals-Abständen zwischen Atomen, denen Abstandsbeschränkungen zugeordnet wurden.

Tabelle 4: Liste der Parameter des Programmes NMR2S (Fortsetzung)

3.5.2 Torsionswinkelvorschau mit TALOS

Die chemischen Verschiebungen der Atome des Proteinrückgrates sind besonders empfindlich gegenüber konformationellen Änderungen. Hier sind in der Vergangenheit vor allem die Korrelation der chemischen Verschiebung des $^1\text{H}^\alpha$ -Atoms mit der Sekundärstruktur sowie des $^1\text{H}^N$ -Atoms mit der Sekundärstruktur untersucht worden. Hierbei hat auch die Verknüpfung der chemischen Verschiebung des $^1\text{H}^N$ mit Wasserstoffbrücken und deren Länge einen grossen Einfluss [31]. α -helikale Strukturen weisen charakteristische chemische Verschiebungen des $^1\text{H}^N$ auf [31]. Ähnliche Beziehungen konnten zwischen den Torsionswinkeln ψ und ϕ und den chemischen Verschiebungen von $^1\text{H}^\alpha$ und $^1\text{H}^\beta$ gefunden werden, die Aussagen über Schleifenregionen erlauben [32]. Durch die Anreicherung mit heteronuklearen Isotopen werden weitere chemische Verschiebungen zugänglich und ermöglichen zusätzliche Aussagen über die Struktur eines Proteins. Die chemischen Verschiebungen von $^{13}\text{C}^\alpha$ und $^{13}\text{C}^\beta$ eines Aminosäurerestes stehen in engem Zusammenhang mit den Torsionswinkeln ψ und ϕ und der Sekundärstruktur [33]. In Abb. 17 sind die Winkel ψ und ϕ in einem Tripeptid dargestellt. Es existieren statistische Verfahren, um Informationen über die chemischen Verschiebungen

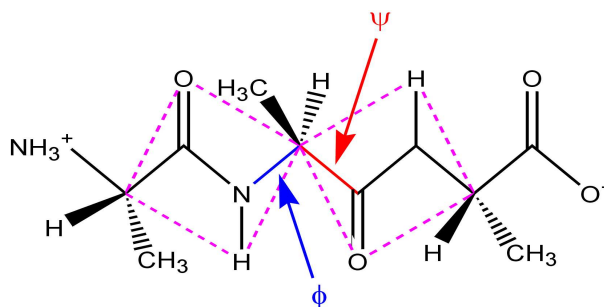


Abbildung 17: Die Winkel ψ und ϕ in einem Tripeptid aus Alanin.

von $^1\text{H}^\alpha$ und $^{13}\text{C}^\alpha$ [34] oder die chemischen Verschiebungen $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$, $^{13}\text{C}'$ und $^1\text{H}^\alpha$ [35] aus dem Vergleich einer Reihe von Proteinstrukturen in Aussagen über Torsionswinkelbeschränkungen und somit Sekundärstrukturen zu übersetzen. Die Korrelation der chemischen Verschiebungen der Atome des Proteinrückgrates $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$, $^1\text{H}^\alpha$, $^1\text{H}^N$ und ^{15}N und den Torsionswinkeln im Proteinrückgrat erweist sich als geeignete Methode, die wahrscheinlichsten Winkel ψ und ϕ zu erhalten [36]. Diese Informationen tragen erheblich zur Verbesserung der Qualität einer Proteinstruktur bei, vor allem dann, wenn wenig Informationen über NOE-Abstandsbeschränkungen zugänglich sind.

Die Sequenzhomologie von Proteinen ermöglicht eine Aussage über ähnliche chemische Verschiebungen [37]. Zur zuverlässigen Anwendung dieser Methode muss eine Sequenzhomologie von mindestens 30% vorliegen [38].

Der Algorithmus TALOS (**T**orsion **a**ngle **l**ikeness **o**btained by chemical shifts) [39] benutzt sowohl Sequenzhomologie als auch Ähnlichkeiten der chemischen Verschiebungen zur Vorhersage der Torsionswinkel im Proteinrückgrat. Hierzu werden jeweils Triplets von Aminosäuren des zu untersuchenden Proteins mit Triplets von Aminosäuren der möglichst gleichen Sequenz in einer Datenbank verglichen. Wenn diese beiden Triplets ähnliche chemische Verschiebungen aufweisen, so haben die zentralen Aminosäurereste der Triplets mit hoher Wahrscheinlichkeit ähnliche Torsionswinkel ψ und ϕ . In TALOS steht eine Datenbank aus 20 Proteinen mit insgesamt etwa 3000 Aminosäureresten und 14000 chemischen Verschiebungen zur Verfügung.

Zur Vorhersage der Torsionswinkel werden experimentell ermittelte chemische Verschiebungen für $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$, $^1\text{H}^\alpha$ und ^{15}N in TALOS eingegeben. Der Algorithmus sucht in der Datenbank die 10 Aminosäuretriplets, die am besten zum gesuchten Triplet innerhalb des untersuchten Proteins passen. Nur wenn alle diese 10 Kandidaten ähnliche Werte für ψ und ϕ aufweisen, werden Mittelwert und Standardabweichung für eine Winkelvorschau verwendet. TALOS unterteilt die Vorhersagen in "gut" (Good) und "zweifelhaft" (Ambiguous). Gut bedeutet dabei, dass entweder

- alle 10 vorhergesagten Kandidaten in der gleichen Region des Ramachandran-Plots liegen
- 9 von 10 Kandidaten in der gleichen Region des Ramachandran-Plots mit $\psi < 0$ liegen und der Ausreisser ebenfalls $\psi < 0$ aufweist
- 9 von 10 Kandidaten in der gleichen Region des Ramachandran-Plots mit $\psi > 0$ liegen und der Ausreisser ebenfalls $\psi > 0$ aufweist.

Gleiche Regionen bedeutet hierbei innerhalb oder nahe an erlaubten Bereichen des Ramachandran-Plots.

Alle anderen Vorhersagen werden als zweifelhaft angesehen. In den Strukturrechnungen werden nur Torsionswinkelbeschränkungen verwendet, die auf "guten" Vorhersagen basieren.

3.5.3 Distanzgeometrie-Rechnungen mit DYANA

Zur Bestimmung der Proteinstruktur werden aus NMR-Spektren gewonnene Abstandsbeschränkungen für atomare Abstände und Torsionswinkel herangezogen. Der Algorithmus DYANA (**D**ynamics **a**lgorithm for **N**MR **a**pplications) berechnet aus diesen Daten Proteinstrukturen im Torsionswinkelraum [40]. Dabei wird eine Bibliothek von Aminosäuren verwendet, die dem Standard des ECPP/2-Kraftfeldes [41] folgt und worin Bindungslängen, Bindungswinkel, Atomsorten und Nomenklatur definiert werden. Während einer Strukturrechnung bleiben so die Bindungslängen und -winkel erhalten. Zur Berechnung der Strukturen wird ein „*simulated annealing*“ [42] verwendet. Das Molekül wird als ein starrer Basiskörper sowie n starre Körper, die

durch n rotierbare Bindungen verbunden sind, angesehen. Als Freiheitsgrade werden ausschliesslich Diederwinkel betrachtet. Die Zielfunktion V übernimmt hierbei die Rolle der potentiellen Energie E_{pot} mit $V = w_0 E_{pot}$, wobei w_0 ein allgemeiner Wichtungsfaktor von $10 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ ist.

$$V = \sum_{c=u,l,v} w_c \sum_{(\alpha,\beta) \in I_c} f_c(d_{\alpha,\beta}, b_{\alpha,\beta}) + w_a \sum_{i \in I_a} \left(1 - \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta_i}{\Gamma_i} \right)^2 \right) \Delta_i^2 \quad (3.4)$$

$d_{\alpha,\beta}$: Abstand zweier Atome α und β

$b_{\alpha,\beta}$: Obere und untere Grenze des Abstands zweier Atome α und β

Eine Zielfunktion von $V = 0$ ist hier definiert, wenn alle experimentell bestimmten Abstandsbeschränkungen und alle Torsionswinkelbeschränkungen erfüllt sind und keine sterische Behinderung nicht miteinander verbundener Atompaare auftritt. Die Funktion f_c stellt den Anteil der nicht erfüllten Abstandsbeschränkungen dar.

Die kinetische Energie E_{kin} lässt sich gemäss Gleichung 3.5 berechnen.

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^n \left[m_k \vec{v}_k^2 + \vec{\omega}_k \cdot I_k \vec{\omega}_k + 2 \vec{v}_k \cdot \left(\vec{\omega}_k \wedge m_k \vec{Y}_k \right) \right] \quad (3.5)$$

Die Form des starren Körpers geht nur über den Trägheitstensor sowie den Massenschwerpunkt in die Bewegungsgleichungen ein. Daher ist es nicht erforderlich, diese Größen aus den Massen sowie den relativen Positionen der einzelnen Atome, die den starren Körper bilden, zu berechnen. Werden alle starren Körper als harte Kugeln der Masse m_k und des Radius ρ zentriert auf ihren Referenzpunkt \vec{r}_k betrachtet, so ergeben sich die Gl. 3.6 und 3.7, die zu einer erhöhten Effizienz des Algorithmus führen.

$$\vec{Y}_k = \vec{0} \quad (3.6)$$

$$I_k = \frac{2}{5} m_k \rho^2 \mathbf{1}_3 \quad (3.7)$$

Die Berechnung der kinetischen Energie gemäß Gl. 3.5 vereinfacht sich dadurch. Zur Implementierung der Bewegungsgleichungen wird eine Variante

des „*leap frog*“-Algorithmus verwendet [43,44]. Zur Temperaturkontrolle wird das System an ein externes Wärmebad gekoppelt [45]. Ein Zeitschritt $t \rightarrow t + \Delta t$, der dem vorangegangenen Schritt $t - \Delta t' \rightarrow t$, folgt, besteht dabei aus folgenden Teilschritten.

1. Auf der Basis der Diederwinkel $\theta(t)$ werden die kartesischen Koordinaten aller Atome berechnet [46].

2. Aus den kartesischen Koordinaten wird die potentielle Energie $E_{pot}(t) = E_{pot}(\theta(t))$ und ihr Gradient $\nabla E_{pot}(t)$ nach Gl. 3.4 berechnet.

3. Der Zeitschritt $\Delta t = \lambda_\varepsilon \Delta t'$ wird bestimmt.

λ_ε basiert auf dem Referenzwert der relativen Genauigkeit der Energieerhaltung ε^{ref} und der relativen Änderung $\varepsilon(t)$ der Gesamtenergie $E = E_{kin} + E_{pot}$ im vorangegangenen Zeitschritt.

$$\varepsilon(t) = \left| \frac{E(t) - E(t - \Delta t')}{E(t)} \right| \quad (3.8)$$

$\lambda_\varepsilon^{max}$ ist der maximal erlaubte Wert des Skalierungsfaktors. τ ist eine Zeitkonstante. Zur Berechnung von $\varepsilon(t)$ wird vor der Skalierung $E(t)$ verwendet, nach der Skalierung aber $E(t - \Delta t')$. Dadurch ist die Bestimmung der Genauigkeit der Energieerhaltung in Gl. 3.8 unbeeinflusst von der Skalierung der Geschwindigkeiten.

4. Die Temperatur wird durch Skalierung der Winkelgeschwindigkeiten angepaßt. $\lambda_T \dot{\theta}(t - \Delta t'/2)$ ersetzt $\dot{\theta}(t - \Delta t'/2)$ und $\lambda_T \dot{\theta}_e(t)$ ersetzt $\dot{\theta}_e(t)$. Der Skalierungsfaktor λ_T ist in [45] gegeben als:

$$\lambda_T = \sqrt{1 + \frac{T^{ref} - T(t)}{\tau T(t)}} \quad (3.9)$$

$$T(t) = \frac{2E_{kin}(t)}{nk_B} \quad (3.10)$$

T^{ref} stellt die Referenztemperatur dar, n ist die Anzahl der Torsionswinkel und k_B ist die Boltzmann-Konstante ($k_B = 1,38 \cdot 10^{-23} JK^{-1}$). Die kinetische Energie E_{kin} wird nach Gl. 3.5 berechnet.

5. Die Winkelbeschleunigungen $\ddot{\theta}(t) = \ddot{\theta}(\theta(t), \dot{\theta}_e(t))$ werden berechnet.

6. Die neuen Geschwindigkeiten zum halben Zeitschritt werden nach

$$\dot{\theta} \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) = \dot{\theta} \left(t - \frac{\Delta t'}{2} \right) + \frac{\Delta t + \Delta t'}{2} \ddot{\theta}(t) \quad (3.11)$$

berechnet.

7. Die genäherten neuen Geschwindigkeiten zum vollen Zeitschritt werden berechnet.

8. Die neuen Winkelpositionen werden nach folgender Gleichung berechnet.

$$\theta(t + \Delta t) = \theta(t) + \Delta t \dot{\theta} \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) \quad (3.12)$$

Der Algorithmus startet bei $t = 0$, $\Delta t' = \Delta t$ und $\dot{\theta}_e(0) = \dot{\theta}(-\frac{\Delta t}{2})$. Die Winkelgeschwindigkeiten $\dot{\theta}(-\frac{\Delta t}{2})$ werden aus einer Normalverteilung zufällig so gewählt, daß die Anfangstemperatur $T(0)$ erreicht wird. Nachdem ein Zeitschritt $t \rightarrow t + \Delta t$ durch Abfolge der acht beschriebenen Teilschritte vervollständigt ist, wird t durch $t + \Delta t$ und $\Delta t'$ durch Δt ersetzt. Die Zeitschritte werden bei der Strukturrechnung möglichst groß gewählt. Damit es hierbei nicht zu großen Energieverletzungen kommt, werden alle Zeitschritte, in denen sich die Energie um mehr als 10% ändert, verworfen und durch zwei Zeitschritte der halben Länge ersetzt.

3.5.4 Energieminimierung mit DISCOVER

An die Strukturrechnung wird eine Energieminimierung angeschlossen, da es sich bei den berechneten Strukturen in der Regel nicht um die energieärmsten handelt. Zur Anwendung kommen hier zwei Algorithmen, *Steepest descent* und *Conjugate Gradient*. Die Suche nach dem Energieminimum erfolgt bei *Steepest Descent* auf einer geraden Linie entlang des Gradienten $-\nabla E(r)$ auf einer Energiehyperfläche. Mit jeder neuen Suche geht eine Richtungsänderung von 90° einher, dies macht den Algorithmus auf Energiehyperflächen mit schmalen Tälern besonders ineffektiv. Zur Berechnung der Kräfte wird folgende Formel verwendet.

$$r_{n-1} = r_n + \frac{F_n}{\max(F_n)} h_n \quad (3.13)$$

h_n stellt hierbei die vorgegebene maximale Abweichung und F_n die Kraft dar. Ebenso steht F_n für den negativen Gradienten des Potentials $-\nabla E(r) = -\nabla V(r)$. Der Nenner des Bruches bedeutet den größten Absolutwert der Kraftkonstanten. An jeder neuen Position werden die Energie und die Kräfte neu berechnet. Im Falle dass $V_{n-1} < V_n$, werden die berechneten Werte akzeptiert und $h_{n-1} = 1.2 \cdot h_n$ gesetzt. Sollte $V_{n-1} \geq V_n$ sein, werden die neuen Koordinaten nicht berücksichtigt und $h_n = 0.2 \cdot h_n$ gesetzt. Der Endpunkt der Berechnung kann durch eine vorher festgelegte Anzahl von Schritten definiert werden oder solange weitergeführt werden bis der Gradient eine bestimmte Größe unterschreitet, die anhand von Gl. 3.14 abgeschätzt werden kann.

$$f = 2\pi\nu\sqrt{2mkT} \quad (3.14)$$

Ein Grund für die Ineffizienz des *Steepest Descent* liegt darin, dass in jedem Teilschritt die Ergebnisse des vorhergehenden Schrittes nicht berücksichtigt werden.

Um dies zu kompensieren wird der Algorithmus *Conjugate Gradient* verwendet. Bei dieser Methode werden die Erfolge eines Teilschrittes im nächsten Teilschritt berücksichtigt und verbessert. Auf diese Art gelingt es, mit jedem Schritt näher an das Energieminimum heran zu gelangen. Jeder neue Richtungsvektor h_{i+1} wird durch Addition des Gradienten am Punkt $i + 1$, g_{i+1} , zur vorherigen Richtung h_i berechnet.

$$h_{i+1} = g_{i+1} + \gamma_i h_i \quad (3.15)$$

wobei für γ_i gilt:

$$\gamma_i = \frac{g_{i+1} \cdot g_{i+1}}{g_i \cdot g_i} \quad (3.16)$$

Eine Kombination aus beiden Algorithmen hat sich als praktikabel erwiesen, wobei zunächst eine Minimierung mit dem "*Steepest Descent*"-Algorithmus und anschließend eine Berechnung mit dem "*Conjugate Gradient*"-Algorithmus durchgeführt wird.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Zuordnung der Resonanzen

4.1.1 Zuordnung der Resonanzen der freien Mutante P395S

Die sequentielle Zuordnung der Resonanzen von P395S erfolgt zunächst nur mit Hilfe von ^{15}N -TOCSY-HSQC [47] und ^{15}N -NOESY-HSQC-Spektren [23], die sequentielle Zuordnung wird durch ein 3D-HNCA- sowie ein 3D-HN(CO)-CA-Experiment vervollständigt. Hierbei können die Signale von vier Aminosäuren in der BC-Schleife nicht zugeordnet werden. Dieser Effekt wird schon früher beobachtet [9] und deutet darauf hin, dass in dieser Region das Protein wenig strukturiert ist. Ebenso erweist sich die Zuordnung der Resonanzen in der EF-Schleife als schwierig. Für die Aminosäuren L396 und F398 kann auch mit Hilfe eines 3D-HNCA- und eines 3D-HN(CO)CA-Experimentes keine sequentielle Zuordnung gefunden werden. Die Aminosäuren dieser Region zeigen insgesamt nur wenige NOESY-Signale über grössere Entfernung innerhalb des Proteins. Dies wird auf eine erhöhte Flexibilität der Mutante in diesem Bereich gegenüber dem Wildtyp zurückgeführt. Anstelle des im Wildtyp vorhandenen Prolins, welches für eine starre Konformation sorgt, befindet sich in der Mutante ein Serin. Dadurch ist die Beweglichkeit der Schleife erhöht. Ähnlich verhält es sich in der BG-Schleife, hier konnten zwar alle Aminosäurereste zugeordnet werden, jedoch zeigten sich auch hier nur sehr wenige NOESY-Signale.

Die Zuordnung der Seitenkettenresonanzen erfolgt mit Hilfe von 3D-(H)C-(CO)NH- und 3D-C(CO)NH-Experimenten. Hier kann eine fast vollständige Zuordnung der Seitenkettenprotonen und -kohlenstoffatome erreicht werden.

4.1.2 Zuordnung der Resonanzen der Mutante P395S mit gebundenem PDGFr

Die sequentielle Zuordnung der Resonanzen der Spinsysteme des Proteins erfolgt ebenfalls mit Hilfe von 3D-HNCA-, 3D-HN(CO)CA-Experimenten sowie eines 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC-Experimentes. Als Grundlage für die Zuordnung dient hier die Zuordnung der Resonanzsignale des freien Proteins,

da davon ausgegangen werden kann, dass viele der Resonanzsignale von der Bindung des Liganden unberührt bleiben. Die Aminosäuren F392 und D394 bis F398 in der EF-Schleife können in den Spektren des komplexierten Proteins nicht gefunden werden.

Die Resonanzen des unmarkierten Peptidliganden werden mit Hilfe eines $^{13}\text{C}\{\text{F1}\}$ -gefilterten 2D-TOCSY-Spektrums identifiziert. Die NOE-Kreuzsignale des Liganden werden durch ein $^{13}\text{C}\{\text{F1}\}$ -gefiltertes 2D-NOESY-Spektrum zugeordnet [48, 49].

4.2 Struktur des freien Proteins

In Abb. 18 ist ein Ensemble aus 20 Strukturen der freien P395S-Mutante in Abwesenheit eines Liganden sowie die Lösungsstruktur von P395S dargestellt. Die Struktur wird mit DYANA berechnet und anschließend einer Energieminimierung mit DISCOVER (MSI) unterzogen. Zur Berechnung werden 1113 Abstandsbeschränkungen aus ^{15}N - und ^{13}C -editierten 3D-NOESY-Spektren sowie 85 Torsionswinkelvorschläge aus TALOS verwendet. Der RMSD für das Ensemble beträgt 1.76 ± 0.39 Å für die Atome des Rückgrates (N, C^α , C') und 2.92 ± 0.52 Å für alle Schweratome. Die DYANA-Rechnungen werden auf einer SGI O2 Workstation durchgeführt. Die Energieminimierungen werden auf einer SGI Indigo2 Workstation durchgeführt.

Es ist deutlich erkennbar, dass die Sekundärstrukturelemente gut definiert sind, während die Schleifenbereiche deutliche Mobilität zeigen. Dies drückt sich auch im RMSD aus. Werden die Bereiche der Schleifen BC, EF und BG bei der Berechnung des RMSD ausgelassen, so werden Werte von 1.52 ± 0.31 Å für die Atome des Rückgrates (N, C^α , C') erhalten. Die RMSD-Werte für unterschiedliche Bereiche der Sequenz sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die Anzahl der Abstandsbeschränkungen ist mit 1113 deutlich geringer als die Anzahl der 2225 Abstandsbeschränkungen, die für den Wildtyp gefunden worden sind [6]. Die Anzahl der Abstandsbeschränkungen ist für Aminosäurereste innerhalb der Schleifenregionen BG und EF besonders gering. Dies schlägt sich in einer erhöhten Flexibilität dieser Schleifenbereiche nieder. Die Struktur zeigt die typischen Merkmale einer SH2-Domäne,

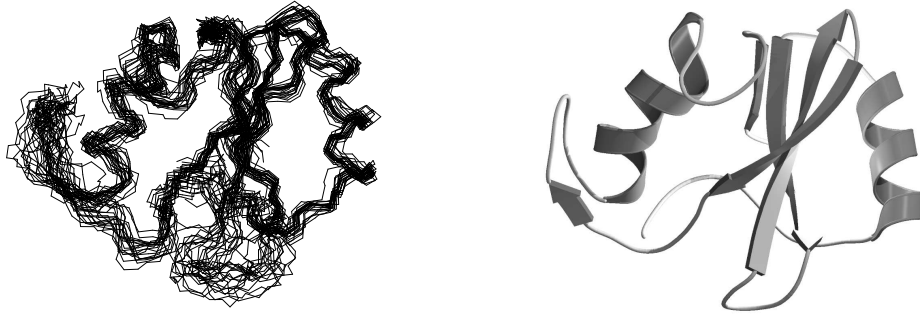


Abbildung 18: **Links:** Bündel aus 20 Strukturen von P395S. Die Strukturen werden mit DYANA berechnet und anschließend mit DISCOVER energie-minimiert. Erkennbar ist, dass die Sekundärstrukturelemente gegenüber den Schleifenregionen besser definiert sind, was auf eine erhöhte Mobilität in den Schleifenregionen zurückgeführt werden kann. **Rechts:** Die Lösungsstruktur von P395S. Das auffälligste Merkmal der Struktur ist die veränderte Lage der Helix α B.

ein zentrales β -Faltblatt sowie zwei flankierende α -Helices. Ebenso sind ein kurzes β -Faltblatt im Bereich der EF-Schleife und ein β -Faltblatt am C-Terminus erkennbar. Die Sekundärstrukturelemente sind durch typische Abstandsbeschränkungen und Torsionswinkelvorschläge gut definiert wie in Abb. 20 erkennbar ist. Eine Zusammenfassung der Informationen über die Abstandsbeschränkungen findet sich in Abb. 19. Hier sind sowohl die Anzahl der Abstandsbeschränkungen als auch die Einteilung der Abstandsbeschränkungen in ihre Klassen pro Aminosäurerest gezeigt. Abb. 21 zeigt ein Ramachandran-Diagramm für die 20 besten Strukturen. Dieses Diagramm wird mit PROCHECK [50] erzeugt. 57.3% der Aminosäurereste befinden sich in den bevorzugtesten Regionen, 30.3% der Reste in erlaubten Regionen, 6.7% in großzügig erlaubten Regionen. 5.6% der Aminosäurereste befinden sich in nicht erlaubten Regionen. Diese außerhalb der bevorzugten Regionen liegenden Aminosäuren befinden sich in den wenig definierten Schleifenregionen des Proteins.

Freie Mutante	
Abstandsbeschränkungen	
Intramolekular ($i-j=0$)	367
Intermolekular ($ i-j <5$)	557
Weit entfernt ($ i-j \geq 5$)	189
Summe	1113
Diederwinkelbeschränkungen	85
RMSD der Atomkoordinaten [Å]	
Aminosäuren 8-111	
Proteinrückgrat	1.76 ± 0.39
Alle Schweratome	2.92 ± 0.52
Aminosäuren 8-40, 45-111	
Proteinrückgrat	1.64 ± 0.33
Alle Schweratome	2.79 ± 0.48
Aminosäuren 8-71, 79-111	
Proteinrückgrat	1.67 ± 0.38
Alle Schweratome	2.78 ± 0.51
Aminosäuren 8-40, 45-71, 79-111	
Proteinrückgrat	1.52 ± 0.31
Alle Schweratome	2.64 ± 0.47
PROCHECK	
Statistik des Ramachandran-Diagramms [%]	
Reste in bevorzugtesten Regionen	57.3
Reste in erlaubten Regionen	30.3
Reste in grosszügig erlaubten Regionen	6.7
Reste in nicht erlaubten Regionen	5.6

Tabelle 5: Strukturstatistik für die Strukturen der freien P395S-Mutante. Alle RMSD werden mit MolMol [51] berechnet.

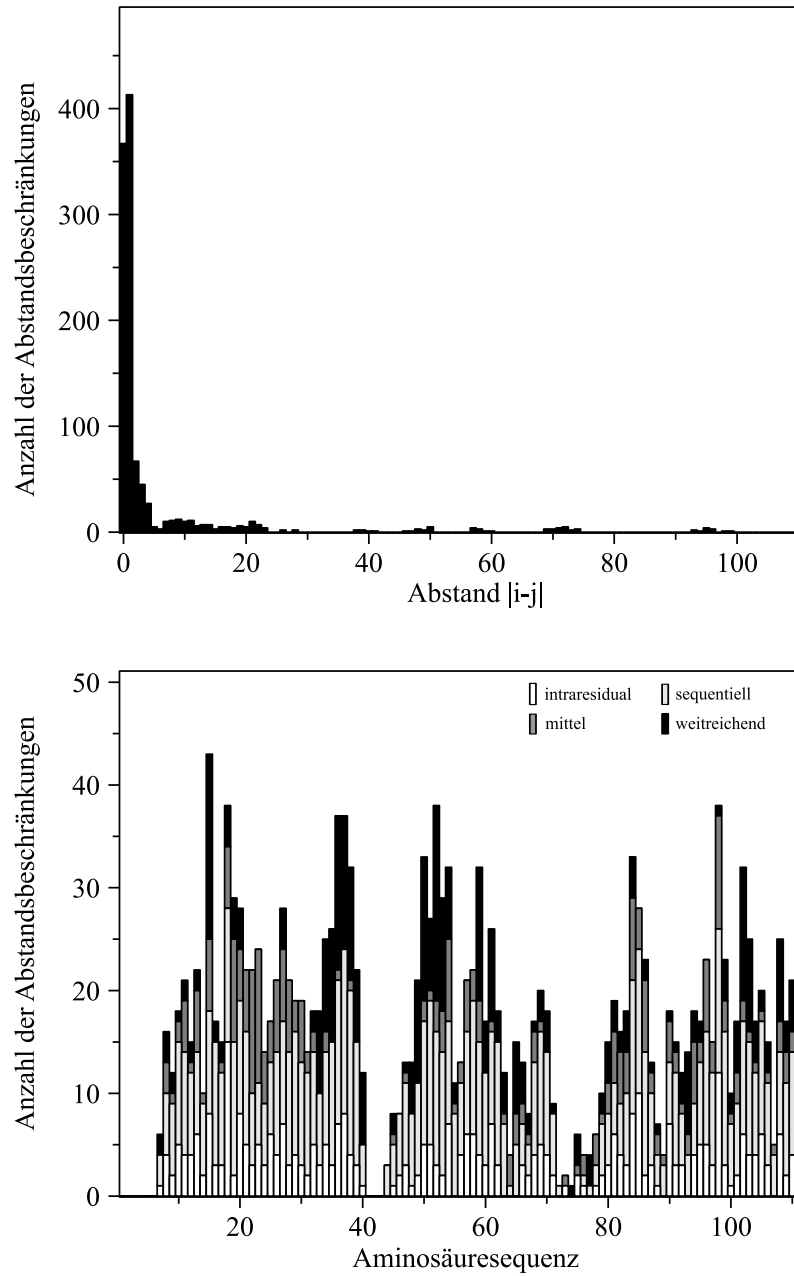


Abbildung 19: **Oben:** Die Anzahl der Abstandsbeschränkungen bezogen auf den sequentiellen Abstand zweier Aminosäuren. **Unten:** Die Anzahl und Art der Abstandsbeschränkungen pro Aminosäurerest für P395S.

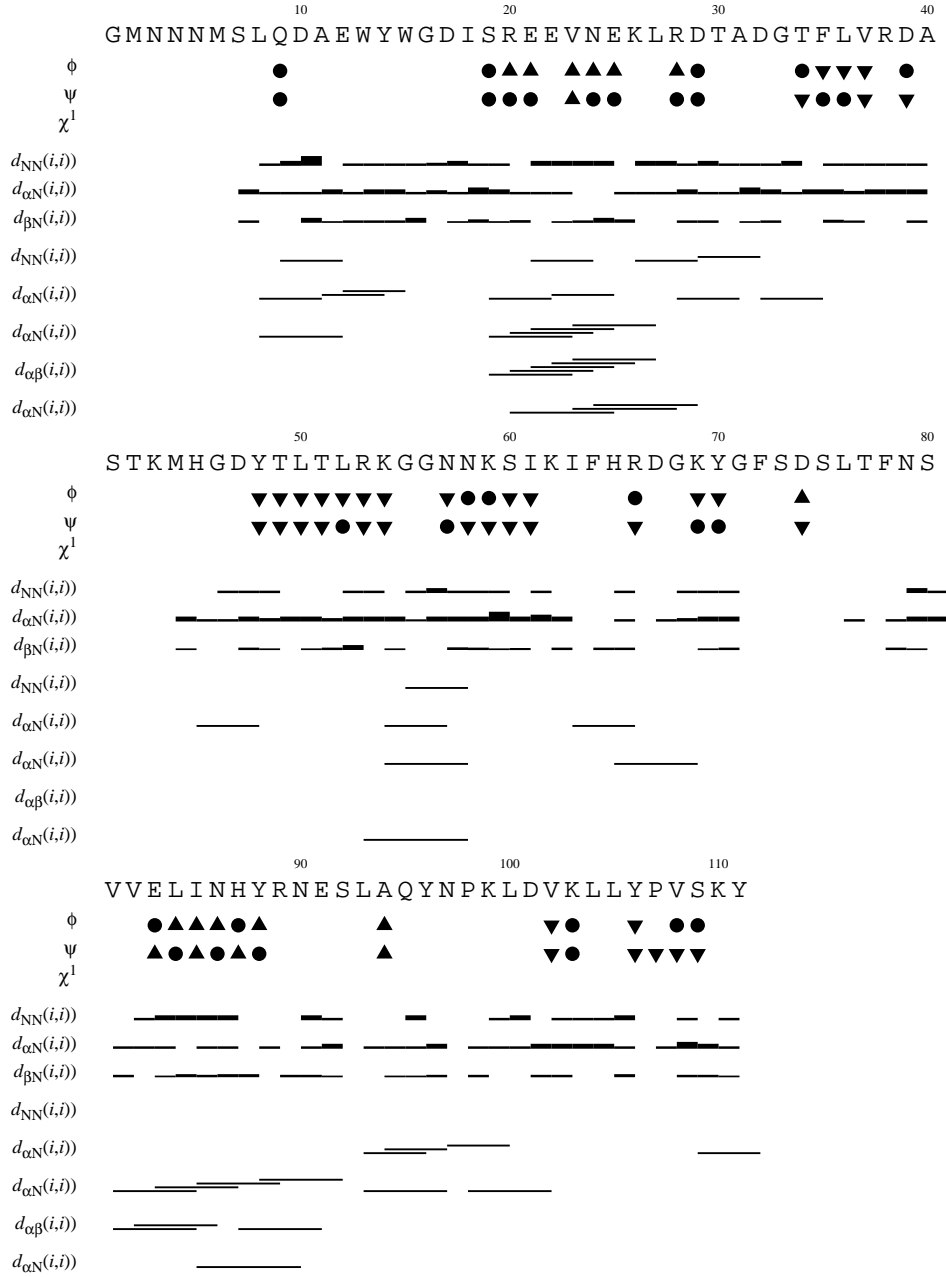


Abbildung 20: Sequenzplot generiert mit DYANA für die Mutante P395S. Die Symbole der Diederwinkel bedeuten: \triangle : α -Helix, ∇ : β -sheet, \bullet : beide Sekundärstrukturelemente möglich.

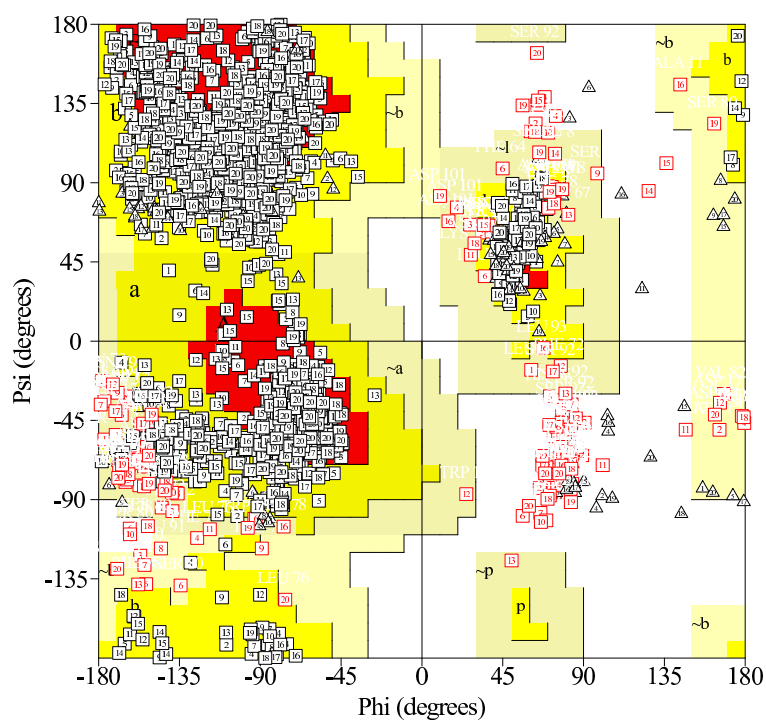


Abbildung 21: Ramachandran-Diagramm erzeugt mit PROCHECK für die 20 besten Strukturen der freien Mutante P395S. Die strukturellen Statistiken betragen: Reste in bevorzugten Regionen 56,7%, Reste in zusätzlich erlaubten Regionen 33,5%, Reste in großzügig erlaubten Regionen 5,6%, Reste in nicht erlaubten Regionen 4,1%.

4.2.1 Vergleich der Struktur des freien Proteins mit dem Wildtyp

Es ist klar erkennbar, dass die Punktmutation innerhalb der Schleife EF großen Einfluß auf die gesamte Struktur von P395S besitzt. In Abb. 23 sind die Rückgrate der Lösungsstrukturen des p85 N-SH2-Wildtyps und der Mutante P395S überlagert. Es ist zu sehen, dass sich die beiden Strukturen im Bereich der Phosphotyrosinbindetasche, der Helix αA und den zentralen β -Faltblättern sehr stark ähneln. So sind alle Unterschiede der Abstände der C^α -Atome am Ende der Helix αA (Aminosäuren 319-321) bis zum Ende der Helix αB (Aminosäuren 357-359) zwischen P395S und dem Wildtyp innerhalb von 1 Å. Ebenso zeigen die Faltblätter βB und βC in der Mutante keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp. Es gibt jedoch deutliche Unterschiede im Bereich der hydrophoben Bindetasche. Das Faltblatt βD besitzt eine Erweiterung ($\beta D'$) von Aminosäure N377 bis R386. Eine Änderung in der Torsion dieses erweiterten Faltblattes ergibt eine geänderte Position der Aminosäuren I383 und F384. I383 ist in der Mutante der hydrophoben Bindetasche zugewandt, F384 erfährt eine Drehung um 90°. Die EF-Schleife bewegt sich in P395S weg vom Kern des Proteins. Daraus resultiert ein Verlust von Wechselwirkungen zwischen der EF-Schleife und dem Rest der Struktur der Mutante. Die Aminosäurereste I381 und I383, die im Wildtyp NOE-Wechselwirkungen mit den Resten Y390, G391 und F392 zeigen, können diese Kontakte in der Mutante nicht aufrecht erhalten. Die EF-Schleife besitzt keine Verbindung mehr zum zentralen Faltblatt. Die Aminosäuren K379 und I381 wechselwirken mit den Resten P418 und K419 in der BG-Schleife, was zu einer leichten Aufwärtsbewegung von βD führt wie in Abb. 22 zu sehen ist.

Aufgrund dieser Veränderungen in der Struktur werden auch charakteristische Wechselwirkungen zwischen den Schleifen EF und BG gestört. Im Wildtyp wird eine Wechselwirkung der aromatischen Seitenketten der Aminosäuren F392 und Y416 gefunden [6]. Dieser Kontakt kann in der Mutante P395S nicht verifiziert werden (s. Abb. 24). Der Verlust dieser Kontakte zwischen diesen beiden Schleifen gibt der BG-Schleife eine erhöhte Flexibilität. Die Helix αB erfährt eine Umorientierung. Während die Helix im Wildtyp

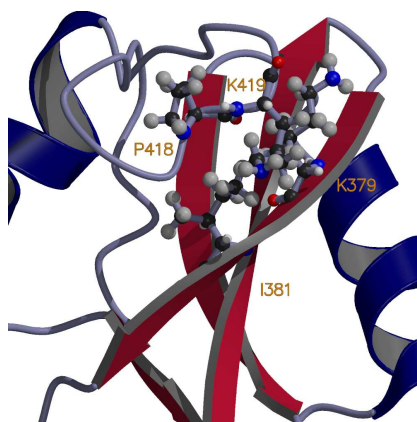


Abbildung 22: Wechselwirkung der Reste K379 und I381 mit den Resten P418 und K419 in der BG-Schleife.

vom zentralen Faltblatt abgewandt ist, befindet sich dieses Strukturelement in der Mutante in einer veränderten Position zum Kern des Moleküls. Das N-terminale Ende von α B ist in P395S etwas weiter entfernt vom zentralen Faltblatt, das C-terminale Ende der Helix ist näher zum zentralen Faltblatt orientiert. So befinden sich zum Beispiel die Aminosäurereste Y408 und R409 näher am zentralen Faltblatt. Der Abstand zu I381 ist um 2.7 Å bzw. 5.2 Å verändert. R409 ist so gedreht, dass es sich in der Mutante näher an Y408 befindet als im Wildtyp.

In der Schleifenregion BG kommt es zu Umorientierungen. Als Konsequenz der fehlenden Kontakte zu EF befindet sich BG näher am Faltblatt β D. Die Abstände der C^α -Atome zwischen N377 am Anfang von β D und den Aminosäureresten S412 bis K423 in der Schleife BG sind in P395S im Durchschnitt um 3.6 Å näher als im Wildtyp. Die Seitenkette von K419 befindet sich in P395S in einem Abstand von 3 Å zu K379 und I381. Wie bereits erwähnt ist die Wechselwirkung zwischen den Seitenketten von Y416 mit F392 in P395S nicht nachweisbar, ein Kontakt von Y416 zu I381 wie im Wildtyp läßt sich in P395S ebenso nicht finden. Die Aminosäure L424 befindet sich in P395S in einer exponierteren Position als im Wildtyp.

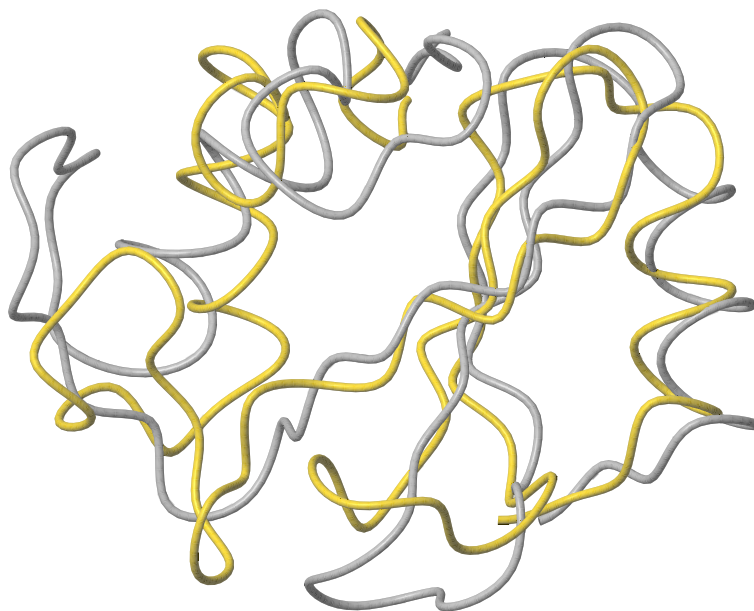


Abbildung 23: Bänderdarstellung der Lösungsstrukturen des p85 SH2-Wildtyps (gelb) und der P395S-Mutante (grau). Die Helix αA und die zentrale Faltblattstruktur sind weitestgehend unverändert. Die Struktur des Wildtyps unterscheidet sich vor allem im Bereich der Schleifen EF und BG sowie der Helix αB von der Struktur der P395S-Mutante.

4.2.2 Änderung der chemischen Verschiebungen von P395S gegenüber dem Wildtyp

Die Änderung der chemischen Verschiebung (CSP) wird mit Hilfe von zwei 2D- ^{15}N -HSQC-Spektren bestimmt. Der Wert der Änderung der chemischen Verschiebungen für die Atome ^{15}N sowie H^N wird nach folgender Formel berechnet:

$$CSP = |5 \cdot \Delta(\delta^1 H)| + |\Delta(\delta^{15} N)| \quad (4.1)$$

Die strukturellen Änderungen schlagen sich ebenso in einer Änderung der Werte der chemischen Verschiebungen der Mutante gegenüber dem Wildtyp nieder. Abb. 25 zeigt, daß die Punktmutation in P395S deutliche Änderung der chemischen Verschiebung der C^α -Atome um mehr als 4 ppm in acht Aminosäureresten sowie erkennbare Änderungen der chemischen Verschiebung der C^α -Atome in weiteren Aminosäureresten verursacht. Diese Ände-

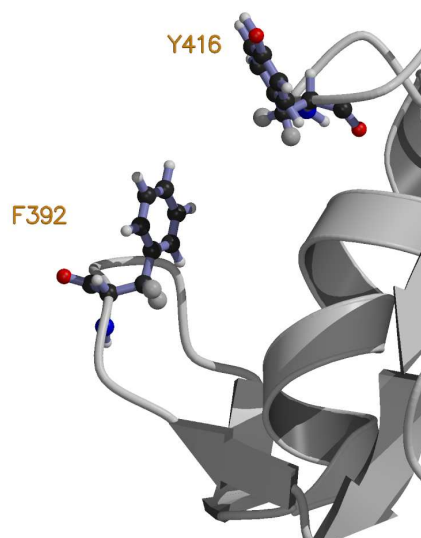


Abbildung 24: Wechselwirkung zwischen den Seitenketten von F392 und Y416.

rungen beginnen im Faltblatt β D und gehen voran bis zur Schleife BG. Unter den Aminosäureresten, welche die stärksten Änderungen der chemischen Verschiebungen aufweisen, befinden sich Y408 und R409. Diese Änderung der chemischen Verschiebung spiegelt die strukturelle Änderung der Helix α B wider. Y416 weist eine deutliche Änderung der chemischen Verschiebung auf, der mit dem Verlust der Seitenkettenwechselwirkung mit F392 zu begründen ist.

Abb. 26 und Abb. 27A zeigen die Änderung der chemischen Verschiebungen der Amidatome des Proteinrückgrates. Es ist erkennbar, daß die Mutation weitreichende Änderungen hervorruft. Die größten Änderungen erfahren die Aminosäurereste in direkter Umgebung der Mutationsstelle. Weitere Änderungen werden innerhalb der Strukturelemente β C bis BG beobachtet. Die Werte der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen der Aminosäurereste V402, E403, H407 und R409, die sich im C-terminalen Ende der Helix α B befinden, sind um mehr als 1 ppm verschoben. Für die Aminosäurereste S400, V401 und N406 sind die chemischen Verschiebungen um mehr als 0.8 ppm verändert. Auf dem Faltblatt β D/ β D' sind die Aminosäurereste K382, I383, R386 und D387 um mehr als 1 ppm verschoben. Eine starke Änderung

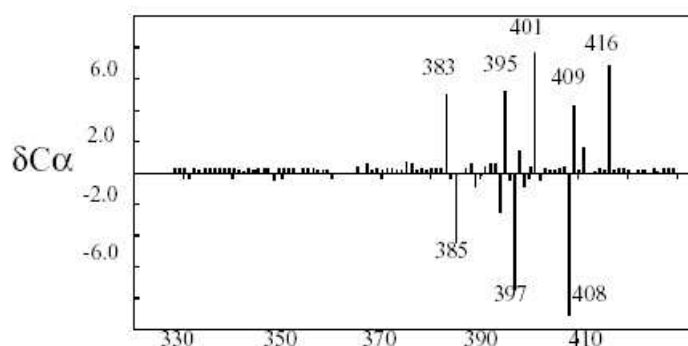


Abbildung 25: Änderung der chemischen Verschiebungen der Resonanzen der C^α -Atome.

der chemischen Verschiebung der Amidprotonen erfahren auch die Aminosäurereste A414 und D421 in der Schleife BG.

4.3 Struktur des Komplexes

Abb. 27 zeigt ein Strukturbündel der 20 besten Strukturen des Komplexes der Mutante P395S mit einem von PDGFr abgeleiteten Peptid nach Distanzgeometrierechnung und Energieminimierung. Zur Berechnung der Protein-Liganden-Struktur wird zunächst die Struktur des Proteins ohne den Peptidliganden berechnet. Die NOE-Kreuzsignale des Liganden werden in die Strukturrechnung einbezogen, nachdem die Struktur des Proteins keine Änderung mehr zeigt. In Tab. 6 sind RMSD-Werte für verschiedene Bereiche des Proteins zusammengestellt. Der RMSD für die 20 besten Strukturen beträgt $1.67 \pm 0.31 \text{ \AA}$ für alle Atome des Proteinrückgrates sowie $2.82 \pm 0.44 \text{ \AA}$ für alle Schweratome. Zur Berechnung wurden 1022 Abstandsbeschränkungen aus ^{15}N - und ^{13}C -editierten 3D-NOESY-Spektren sowie 91 Torsionswinkelvorschläge aus TALOS verwendet. Die DYANA-Rechnungen werden auf einer SGI O2 Workstation durchgeführt. Die Energieminimierungen werden auf einer SGI Indigo2 Workstation durchgeführt. Für den unmarkierten Peptidliganden konnten 37 Abstandsbeschränkungen (davon 20 intermolekulare und 17 intramolekulare) durch ein ^{13}C -{F1}-gefiltertes 2D-NOESY-Spektrum identifiziert werden. Die Sekundärstrukturelemente sind

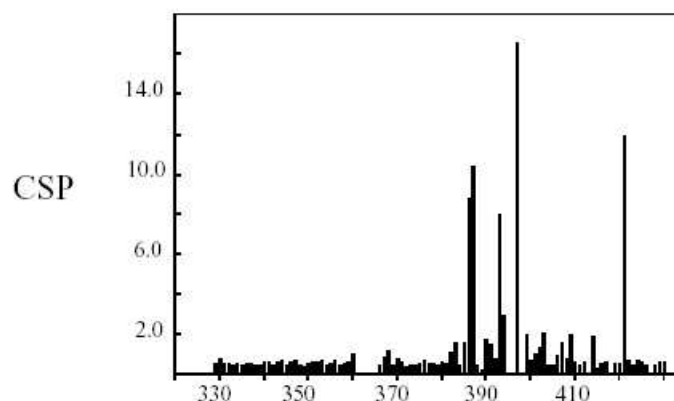


Abbildung 26: Änderung der chemischen Verschiebungen der N^H -Atome verursacht durch die Mutation. Die Änderungen werden mit Hilfe der Formel $|5 \cdot (\delta^1 H)| + |(\delta^{15} N)|$ berechnet.

durch typische Abstandsbeschränkungen und Torsionswinkelvorschlägen gut definiert wie in Abb. 30 erkennbar ist. Eine Zusammenfassung der Informationen über die Abstandsbeschränkungen findet sich in Abb. 29. Hier sind sowohl die Anzahl der Abstandsbeschränkungen als auch die Einteilung der Abstandsbeschränkungen in ihre Klassen pro Aminosäurerest gezeigt. Abb. 31 zeigt ein Ramachandran-Diagramm für die 20 besten Strukturen. 59.6% der Aminosäurereste befinden sich in den bevorzugtesten Regionen, 32.6% der Reste in erlaubten Regionen, 5.6% in großzügig erlaubten Regionen. 2.2% der Aminosäurereste befinden sich in nicht erlaubten Regionen. Als eine der Hauptschwierigkeiten bei der Aufklärung der Struktur des Komplexes erweist sich die Zuordnung der Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand. Da es nicht möglich gewesen ist, NOE-Wechselwirkungen für die Phosphatgruppe des Phosphotyrosins zu detektieren, werden aus der Kristallstruktur bekannte Wechselwirkungen der Phosphatgruppensauerstoffatome in die Strukturrechnung mit DYANA aufgenommen. Da die Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand auch aus Änderungen der chemischen Verschiebungen abgeleitet werden können, werden nicht eindeutige NOE-Wechselwirkungen mit Änderungen der chemischen Verschiebungen korreliert. Die Kontakte zwischen PDGFr und P395S sind in Abb. 32 zusammengefasst. Im Vergleich zu einer

Komplex mit PDGFr	
Abstandsbeschränkungen	
Intramolekular ($i-j=0$)	372
Intermolekular ($ i-j <5$)	459
Weit entfernt ($ i-j \geq 5$)	231
Summe	1062
Diederwinkelbeschränkungen	91
RMSD der Atomkoordinaten [Å]	
Aminosäuren 8-111	
Proteinrückgrat	2.58 ± 0.65
Alle Schweratome	3.62 ± 0.66
Aminosäuren 8-40, 45-111	
Proteinrückgrat	2.42 ± 0.68
Alle Schweratome	3.43 ± 0.67
Aminosäuren 8-71, 79-111	
Proteinrückgrat	1.93 ± 0.36
Alle Schweratome	3.08 ± 0.47
Aminosäuren 8-40, 45-71, 79-111	
Proteinrückgrat	1.67 ± 0.31
Alle Schweratome	2.82 ± 0.44
PROCHECK	
Statistik des Ramachandran-Diagramms [%]	
Reste in bevorzugtesten Regionen	59.6
Reste in erlaubten Regionen	32.6
Reste in grosszügig erlaubten Regionen	5.6
Reste in nicht erlaubten Regionen	2.2

Tabelle 6: Strukturstatistik für den Komplex der Mutante P395S mit einem von PDGFr abgeleiteten Peptid. Alle RMSD werden mit MolMol [51] berechnet.

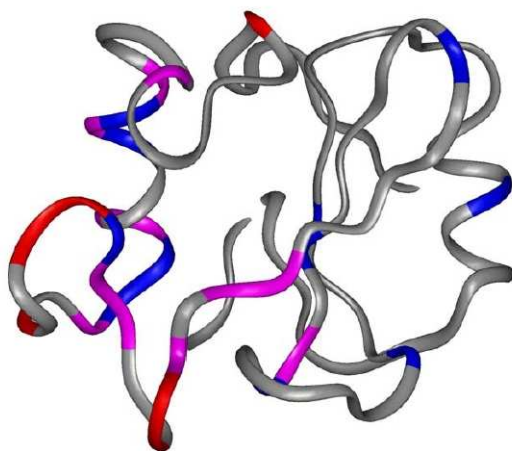


Abbildung 27A: Übersicht der Änderungen der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen in der P395S SH2-Struktur. Die Farben bedeuten die Größe der Änderung. Blau: $0,6 \text{ ppm} < \text{CSP} < 1,0 \text{ ppm}$; Magenta: $1,0 \text{ ppm} < \text{CSP} < 2,0 \text{ ppm}$; Rot $> 2,0 \text{ ppm}$.

früheren Komplexstruktur des Wildtyps [6] ist die Lage des Peptidrückgrates des Liganden in der Struktur verändert, der Kontakt zum zentralen Faltblatt βD erfolgt in P395S durch die Aminosäure S380, während dieser Kontakt im Wildtyp durch die Aminosäuren I381 und K382 erfolgt. Wird die Struktur des Komplexes mit der Struktur des unkomplexierten P395S verglichen, so werden einige Unterschiede deutlich. Das N-terminale Ende der Helix αB bewegt sich in Richtung des Faltblattes βD , so daß sich die C^α -Atome der Aminosäurereste S400 und V401 etwa 4 \AA näher an I381 befinden als in der freien Mutante. Das C-terminale Ende der Helix αB entfernt sich von βD . Daraus resultiert eine um $2.5 - 4.5 \text{ \AA}$ größere Entfernung der C^α -Atome der Aminosäuren 408-410 zu I381 im Vergleich zum unkomplexierten Protein. Die Schleife BG erfährt ebenso eine Bewegung weg vom Kern des Moleküls. Die Lage des C^α -Atoms von N417 ist um etwa 6 \AA in Bezug auf I381 verändert. Die Positionen der Aminosäuren Q415, Y416 und K419 sind um mehr als 3 \AA verschoben. Das Faltblatt βD erfährt durch diese veränderten Positionen eine Drehung. Eine Überlagerung der Proteinrückgrate der beiden Strukturen ist in Abb. 33 zu sehen.

Bei Betrachtung der Bindung des Liganden sind Unterschiede in der Koordination des Phosphotyrosins erkennbar. So ist A360 an der Bindung des



Abbildung 27: **Links:** Strukturbündel des Komplexes (Ligand nicht gezeigt). **Rechts:** Richardson-Diagramm der Mutante P395S im Komplex mit einem von PDGFr abgeleiteten Peptid (Ligand nicht gezeigt).

aromatischen Ringes der Tyrosinseitenkette beteiligt. Die Aminosäure R340 innerhalb der Helix αA befindet sich um 2.72 Å weiter von der Phosphatgruppe entfernt. Die Aminosäure K382 befindet sich in P395S deutlich näher an der Seitenkette des Phosphotyrosins des Liganden als im Wildtyp.

Es ist bekannt, daß der P395S-Mutante die Spezifität für die Position +3 des Liganden fehlt. Die hydrophobe Bindetasche für diese Position erscheint in der Mutante geöffnet als im Wildtyp. Abb. 39 zeigt eine Kalottendarstellung des komplexierten Wildtyps sowie des P395S-Komplexes. Der Methioninrest des Liganden in Position +3 ist grün gezeigt. Es ist erkennbar, dass sich die Seitenkette des Met +3 in P395S in einer exponierteren Lage befindet. Diese Position folgt aus Veränderungen in den Schleifen BG und EF. In der Mutante sind keine Kontakte kleiner als 3 Å zwischen F392 in EF und K419 in BG nachweisbar, es finden sich wenige Kontakte zwischen F392 und L420. Der beobachtete Verlust der Spezifität kann mit dieser geöffneten Struktur der Bindetasche erklärt werden. Jedoch lassen sich Kontakte des Met +3 mit dem Faltblatt βD zu den Aminosäuren K379, S380, I381 und K382 sowie Kontakte zu L420 in der Komplexstruktur auffinden. Dies unterstützt die Ansicht, daß eine unspezifische Bindung des Met +3 zur Affinität der Ligandenbindung beiträgt.

Die Mutante P395S zeigt eine deutlich höhere Affinität zu Valin in Position +1 des Liganden, der Wildtyp bevorzugt hier Methionin. Dies erklärt den Verlust der Affinität zu MT, während die Bindung von PDGFr aufrecht erhalten wird. Val +1 befindet sich in der komplexierten Mutante weiter im Innern der Bindetasche als das Met +1 im Komplex des Wildtyps. Die Art der Bindung des Liganden an der Oberfläche von P395S führt dazu, dass das Val +1 in der Struktur durch die Reste +2, +3 und das Phosphotyrosin verdeckt wird. Der Ligand nimmt eine Position näher zum N-terminalen Ende des Faltblattes β D ein, was zu einer geänderten Wechselwirkung des Liganden mit K359 und I381 führt. Der Kontakt zu K419, der im Wildtyp zu finden ist, wird in P395S nicht aufrecht erhalten, da sowohl die Position des Liganden als auch die Struktur der Schleife BG verändert sind. Aus der neuen Lage des Peptids resultiert eine Annäherung des Prolins +2 an die Aminosäure K382. Da für Prolin jedoch in „*peptide fishing*“-Experimenten keine Spezifität nachgewiesen werden konnte, kann über den Einfluß dieser Wechselwirkung auf die Spezifität keine Aussage getroffen werden.

4.3.1 Änderung der chemischen Verschiebungen von P395S bei Bindung von PDGFr

In Abb. 35 sind die Änderungen der chemischen Verschiebungen der C $^{\alpha}$ -Atome nach der Bindung des Liganden SVDpYVPML-NH₂, dessen Sequenz von PDGFr abgeleitet wird, dargestellt. Eine große Anzahl von Aminosäureresten ist betroffen. Die auffälligsten Änderungen erfahren die Aminosäuren R340 (-3.43 ppm), I383 (5.08 ppm), V401 (7.63 ppm), Y408 (-9.17 ppm), Y416 (6.26 ppm) und N417 (9.76 ppm). Weitere Signale, die sich um mehr als 1 ppm ändern, sind F384 in β D, G391 und S393 in β E und EF, H407, R409 und N410 in der Helix α B und D421 in der Schleife BG. Reste, deren chemische Verschiebung sich um mehr als 0.5 ppm ändern, sind D337 vor der Helix α A, D359 in β B, A360 und H365, die die Schleife BC flankieren, D367, L404 in der Helix α B sowie L413, A414, K419 und L425 in der BG-Schleife. Die Abb. 36 zeigt die Änderungen der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen und -stickstoffatome. Dazu wird eine Lösung des Peptidliganden

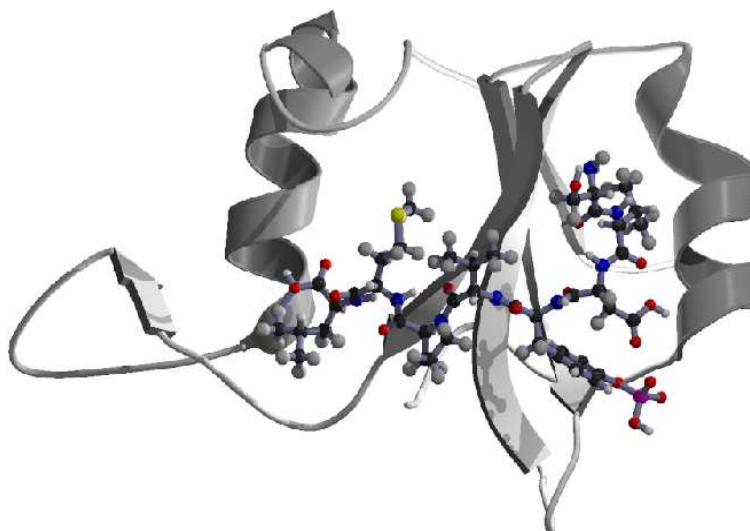


Abbildung 28: Richardson-Diagramm der Mutante P395S im Komplex mit einem von PDGFr abgeleiteten Peptid. Der Peptidligand ist in „ball-and-stick“-Darstellung gezeigt.

sukzessive zu einer Probe des freien Proteins P395S pipettiert. Nach jeder Zugabe des Liganden wird ein 2D- ^{15}N -HSQC-Spektrum aufgenommen, der Anfangs- und Endzustand sind in Abb. 34 gezeigt. Die Änderungen werden nach Gl. 4.1 berechnet. Hier zeigt sich eine große Zahl von Änderungen, die durch die Bindung des Peptidliganden verursacht werden. Die Änderungen der chemischen Verschiebungen bei Bindung eines Liganden innerhalb eines 2D- ^{15}N -HSQC-Spektrums können Bindestellen im Protein zugeordnet werden. Im vorliegenden Fall können drei Hauptregionen bestimmt werden: die Bindestelle des Phosphotyrosins, das zentrale Faltblatt sowie die BG-Schleife. Die Aminosäurereste 338 bis 342 sowie 358 bis 360 zeigen starke Änderungen der chemischen Verschiebungen des Amidprotons, da hier das Phosphotyrosin gebunden wird. Aminosäuren auf dem zentralen β -Faltblatt binden das Valin in Position +1 zum Phosphotyrosin. Des weiteren zeigen sie Wechselwirkungen zum Methionin in Position +3. Dies drückt sich in Änderungen der chemischen Verschiebungen der Aminosäurereste K379, S380, I381, I383 und F384

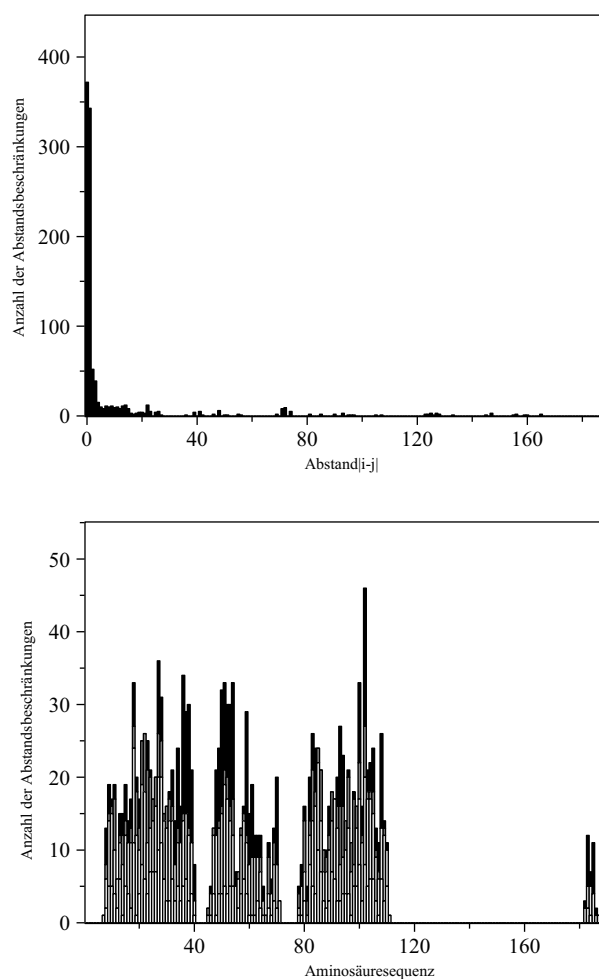


Abbildung 29: **Oben:** Die Anzahl der Abstandsbeschränkungen bezogen auf den sequentiellen Abstand zweier Aminosäuren. **Unten:** Die Anzahl und Art der Abstandsbeschränkungen pro Aminosäurerest für P395S komplexiert mit PDGFr. Die Aminosäuren des Liganden haben die Nummern 182 bis 189.

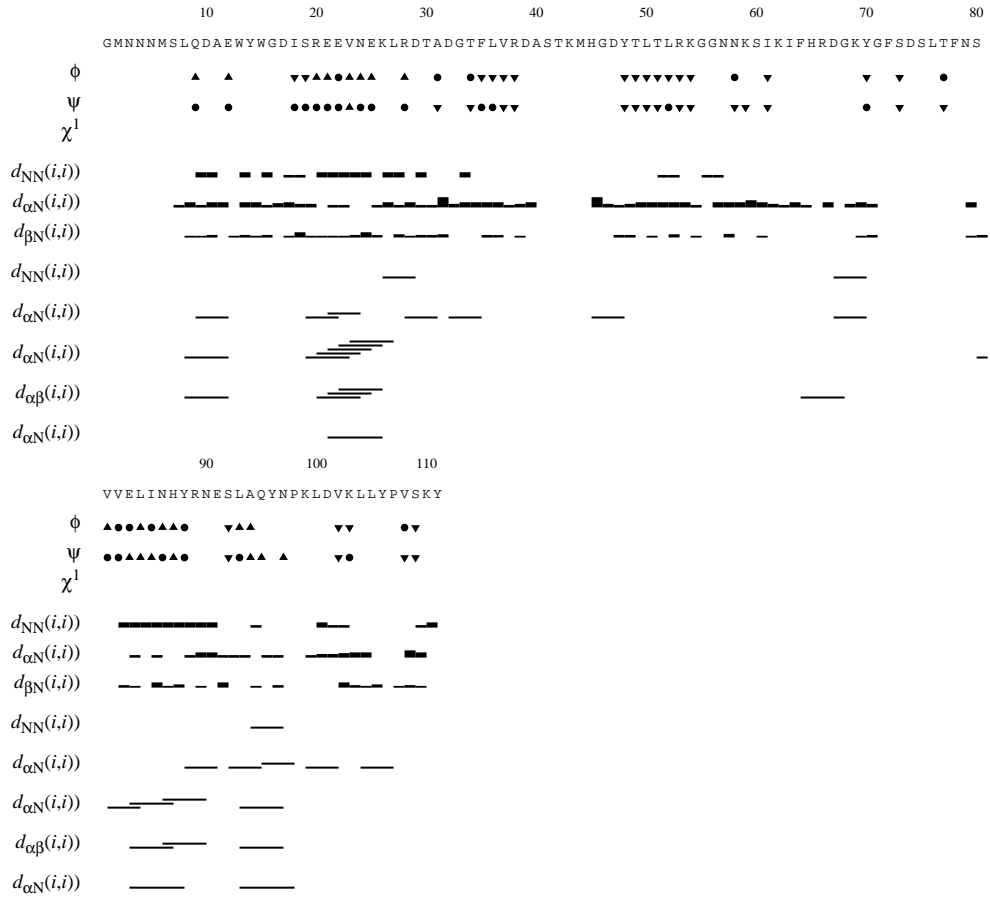


Abbildung 30: Sequenzplot generiert mit DYANA für die Mutante P395S im Komplex mit PDGFr. Die Symbole der Diederwinkel bedeuten: \triangle : α -Helix, ∇ : β -sheet, \bullet : beide Sekundärstrukturelemente möglich.

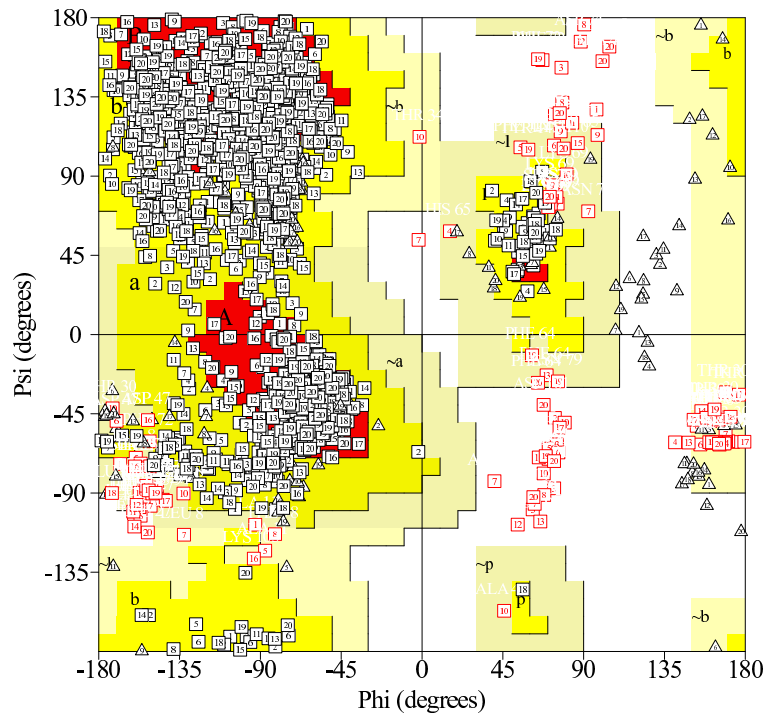


Abbildung 31: Ramachandran-Diagramm aus PROCHECK für die 20 besten Strukturen des Komplexes von P395S mit einem von PDGFr abgeleiteten Peptid. Die strukturellen Statistiken betragen: Reste in bevorzugten Regionen: Reste in zusätzlich erlaubten Regionen 32.6%, Reste in großzügig erlaubten Regionen 5.6%, Reste in nicht erlaubten Regionen 2.2%.

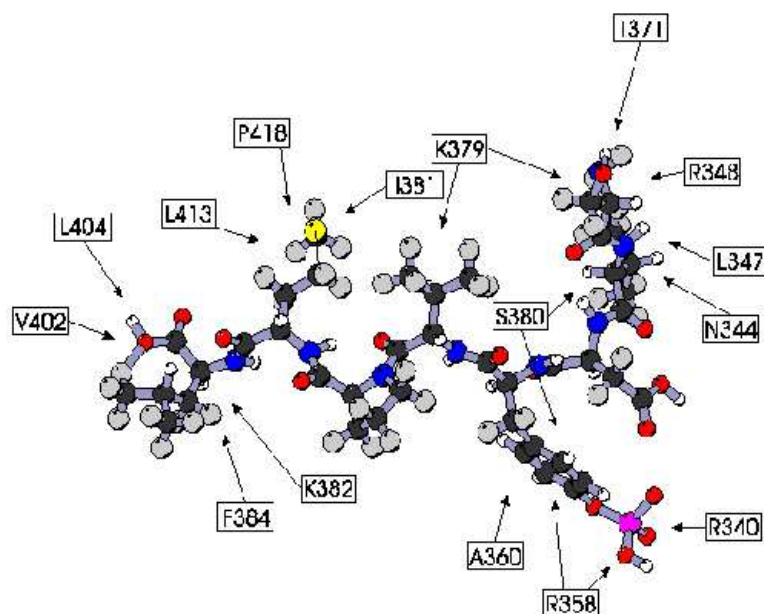


Abbildung 32: Wechselwirkung des Peptidliganden mit spezifischen Seitenketten der SH2-Domäne.

aus. Die BG-Schleife koordiniert das C-terminale Ende des Peptidliganden. Hier werden Änderungen der chemischen Verschiebungen der Aminosäuren N417, K419, L420, V422, L424, L425 und Y426 beobachtet. Die N-terminale Region des Liganden wird von der Helix αA gebunden. Hier treten Änderungen der chemischen Verschiebungen der Aminosäuren I338, S339, R340, E341, E342, N344, K346 und L347 auf. Die Strukturrechnung des Protein-Peptid-Komplexes ergibt 27 Wasserstoffbrückenwechselwirkungen zwischen Protein und Ligand. Diese theoretisch berechneten Wasserstoffbrücken korrelieren gut mit den beobachteten Änderungen der chemischen Verschiebungen. Alle Resultate deuten auf eine Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand. Der N-Terminus des Liganden wird zwischen der Helix αA und dem zentralen β -Faltblatt gebunden. Die Seitenketten der Aminosäuren R340 und R358 wechselwirken mit der Phosphatgruppe und dem aromatischen Ringsystem des Phosphotyrosins (s. Abb. 28). Zusätzlich wird der Phenylring von A360 koordiniert. Das Faltblatt βD , insbesondere die Aminosäuren K379, S380, I381 und K382, geht hydrophobe Wechselwirkungen



Abbildung 33: Vergleich der Struktur der freien Mutante P395S (orange) und der Struktur des Komplexes mit PDGFr (grau).

mit der Position +1 (Valin) sowie der Position +3 (Methionin) ein. Verglichen mit der Struktur des Wildtyps stellen die Aminosäuren K379 (β D3) und I381 (β D5) eine größere Oberfläche für hydrophobe Wechselwirkungen zur Verfügung. Der C-Terminus des Liganden interagiert ebenfalls durch hydrophobe Kontakte mit den Aminosäuren L413, P418 und K419 in der BG-Schleife. Die Position +4 im Liganden (Leucin) zeigt Kontakte zu den Aminosäuren V402 und L404 in der Helix α B. Dadurch wird ein Knick von etwa 90° im gebundenen Peptidliganden verursacht. Der C-Terminus ist tief zwischen zentralem Faltblatt, Helix α B und BG-Schleife vergraben.

4.3.2 Änderung der chemischen Verschiebungen von P395S bei Bindung von Polyomavirus-MiddleT-Antigen

In Abb. 37 sind die Änderungen der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen und -stickstoffe von P395S bei Bindung des Peptids EEepYMP-MEDLpYLDIL-NH₂ gezeigt. Dieses Peptid stellt die Sequenz des SH2-bindenden Polyomavirus-MiddleT-Antigens (MT) dar und enthält zwei Phos-

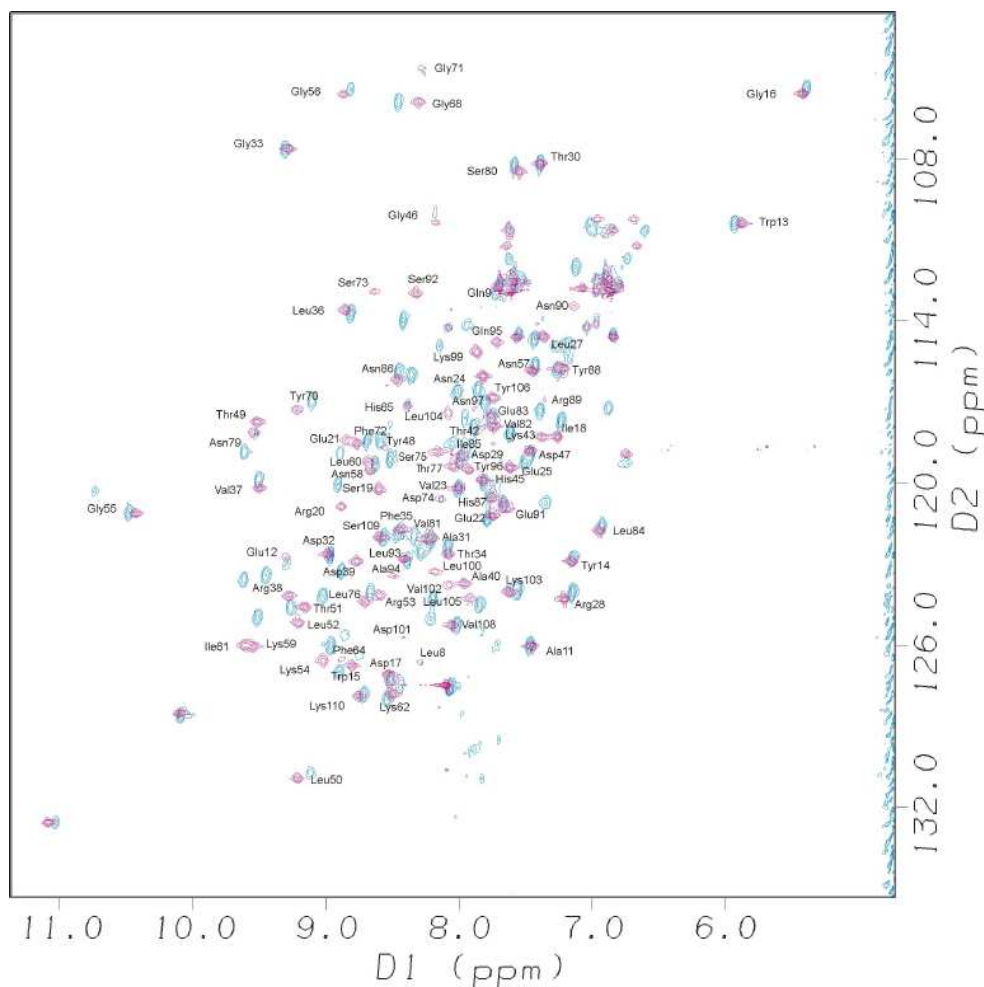


Abbildung 34: 2D- ^{15}N -HSQC-Spektren der freien Mutante P395S (rot) sowie des Komplexes mit PGDFr (blau).

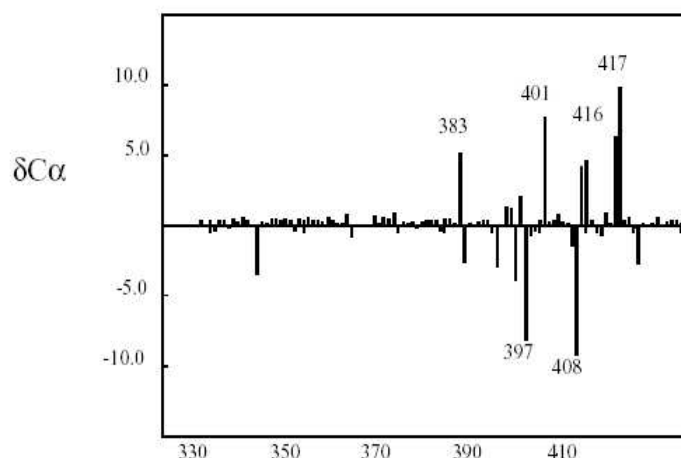


Abbildung 35: Änderung der chemischen Verschiebungen der C α -Atome nach der Bindung des Liganden.

photyrosine. Die Bindung dieses Peptids ist in P395S schwächer als im Wildtyp. Es werden folgende Änderungen der chemischen Verschiebungen größer als 1 ppm beobachtet: D339 (1.466 ppm), R340 (1.296 ppm), E341 (1.109 ppm), N344 (1.614 ppm), E345 (1.321 ppm), R358 (2.134 ppm), A360 (1.335 ppm), H365 (5.445 ppm), D367 (1.028 ppm), Y368 (1.732 ppm), L372 (1.638 ppm), K374 (1.690 ppm), K379 (2.126 ppm), S380 (1.128 ppm), I381 (2.912 ppm), F384 (1.397 ppm), H385 (1.206 ppm), G388 (2.078 ppm), G391 (1.084 ppm), F392 (2.630 ppm), N399 (1.105 ppm), V402 (3.509 ppm), Y408 (1.099 ppm), N410 (1.636 ppm), E411 (1.348 ppm), S412 (1.375 ppm), A414 (1.022 ppm), Q415 (3.179 ppm), Y416 (2.047 ppm), K419 (3.463 ppm), L420 (2.665 ppm), V422 (1.691 ppm) und L424 (1.065 ppm). Die Aminosäuren 339 bis 341 sowie 358 bis 360 binden das erste Phosphotyrosin. Wie durch die Änderung der chemischen Verschiebungen der Reste 372, 374, 379 bis 381, 384 und 385 deutlich wird, bindet das zentrale Faltblatt die Position +1. Die Aminosäuren 388, 391, 392 und 399 binden die Position +3. Das C-terminale Ende des Peptidliganden wird von der Helix α B koordiniert. Das zweite Phosphotyrosin wird von der BG-Schleife gebunden (vgl. hierzu [6]).

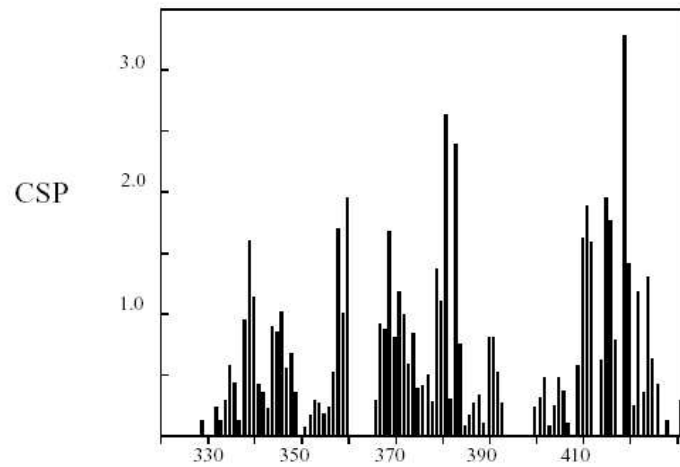


Abbildung 36: Änderung der chemischen Verschiebungen der Amid-Atome nach der Bindung des Liganden.

4.4 Diskussion

Ausgehend von der großen Anzahl an Proteinen, die SH2-Domänen enthalten, und der ebenso großen Anzahl an möglichen phosphorylierten Zielen, besteht gesteigertes Interesse, das Bindungsverhalten von SH2-Domänen zu verstehen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Einblick in das Bindungsverhalten einer SH2-Mutante aus PI3-Kinase gegeben werden. Diese Mutante, P395S, zeigt eine veränderte Spezifität. Das Protein ist nicht in der Lage, Polyomavirus-MiddleT-Antigen (pYMPM) zu binden. Dagegen konnte die Bindung einer Sequenz abgeleitet von PDGFr (pYVPM) weiterhin beobachtet werden. Im Vergleich zum Wildtyp wird eine Abnahme der Spezifität für die Position +3 nach dem Phosphotyrosin sowie eine Erhöhung der Spezifität für die Position +1 festgestellt. Dies bedeutet eine bevorzugte Bindung von Valin gegenüber Methionin. Dieser kompensierende Unterschied ermöglicht P395S weiterhin PDGFr zu binden. Polyomavirus-MiddleT-Antigen kann aufgrund des Met in +1 nicht mehr gebunden werden. In der vorliegenden Arbeit konnten Strukturen der freien Mutante P395S und eines P395S-PDGFr-Komplexes bestimmt werden. Der Vergleich der erhaltenen Struktur der Mutante mit dem Wildtyp ergibt eine zufriedenstellende Erklärung für das Bindungsverhalten der Mutante. Die Struktur der Mutante wird

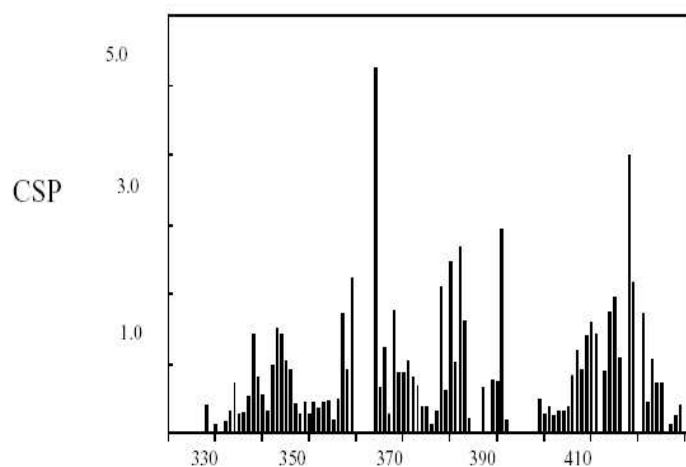


Abbildung 37: Änderung der chemischen Verschiebungen der Amidatome bei Bindung von EEEpYMPME-NH₂ (MT).

bestimmt, um durch die Mutation verursachte Änderungen in der dreidimensionalen Struktur aufzuklären. Des weiteren sind Unterschiede in den Werten der chemischen Verschiebungen zwischen Wildtyp und Mutante untersucht worden.

Obwohl die Punktmutation in Position 395 in einer der Proteinoberfläche zugewandten Schleifenregion lokalisiert ist, werden durch sie nicht nur strukturelle Änderungen in der EF-Schleife hervorgerufen. Im Gegensatz zur Struktur des Wildtyps hat die EF-Schleife jeden Kontakt zum Rest der Struktur verloren. Spezielle Wechselwirkungen wie z.B. die Stapelung von F392 und Y416 konnten nicht gefunden werden. Es hat sich gezeigt, dass β D auf dem zentralen Faltblatt, die Helix α B sowie die BG-Schleife von der Mutation betroffen sind. Die Schleife BG ist mehr zum zentralen Faltblatt gewandt und zeigt eine erhöhte Flexibilität. Ebenso befindet sich die Helix α B näher am zentralen Faltblatt. Das Faltblatt β D ist so verdreht, dass I383 und F384 in veränderte Positionen gelangen. I383 befindet sich nun in der Nähe der hydrophoben Bindetasche. Diese strukturellen Unterschiede zwischen Wildtyp und Proteinmutante in den berechneten Strukturen spiegeln sich auch in der Analyse der Änderungen der chemischen Verschiebungen sowohl der C α -Atome als auch in ¹⁵N-HSQC-Spektren (CSP) wider. Änderungen wer-

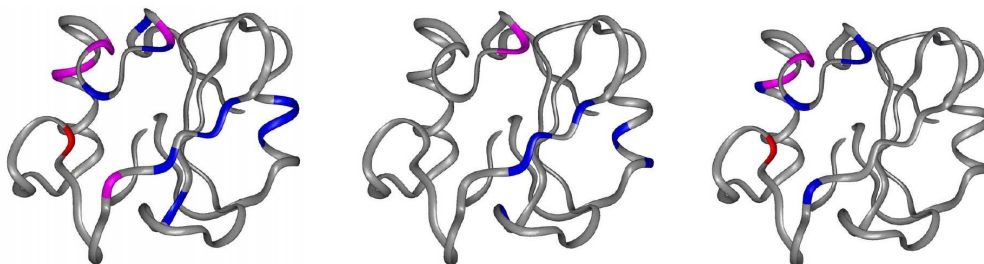


Abb. 38: Vergleich der Reaktionen des Wildtyps und P395S auf verschiedene Peptide. Links: Unterschied in der CSP zwischen MT und PDGFr gebunden an P395S. Blau bedeutet hierbei $>0,5 \text{ ppm} < 0,8 \text{ ppm}$; Magenta $> 0,8 \text{ ppm} < 1,5 \text{ ppm}$; Rot $> 2,5 \text{ ppm}$. Mitte: Unterschied zwischen MT und PDGFr gebunden an den Wildtyp. Blau bedeutet hierbei $> 0,5 \text{ ppm} < 0,8 \text{ ppm}$; Magenta $> 0,8 \text{ ppm} < 1,5 \text{ ppm}$. Rechts: Unterschiede zwischen den beiden vorherigen Fällen. $|CSP(MT) - CSP(PDGFr)|_{P395S} - |CSP(MT) - CSP(PDGFr)|_{Wildtyp}$.

den im Bereich des zentralen Faltblattes, der Schleifen EF und BG sowie der Helix αB beobachtet. Frühere Studien mit modifizierten Peptidliganden zeigen, dass die N-SH2-Domäne eine höchst interaktive Struktur besitzt [8]. Ein Austausch des Restes +1 beeinflusst die Bindung des Restes +3 und umgekehrt. Die Resultate für P395S bestätigen diese interaktive Natur der SH2-Struktur.

Durch die Bindung eines Liganden erfährt die Struktur von P395S signifikante Veränderungen. Die Aminosäurereste F392 und S395 konnten nicht zugeordnet werden. Dadurch konnte keine detaillierte Strukturinformation über die EF-Schleife erhalten werden. Das Faltblatt βD sowie die Schleife BG bewegen sich bei Bindung des Liganden auseinander. Der N-Terminus der Helix αB ändert seine Lage in Richtung des zentralen Faltblattes, während sich der C-Terminus von der zentralen Struktur entfernt. Diese strukturellen Änderungen finden sich auch in der Änderung der chemischen Verschiebungen bei der Bindung des Liganden durch P395S wieder. In dieser Hinsicht verhält sich die P395S-Mutante ähnlich wie der Wildtyp, der bei Ligandenbindung auch Änderungen der chemischen Verschiebungen aufweist [8].

Die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen legen zwei Gründe für den Verlust der Spezifität zur Bindung der Position +3 des Liganden nahe. In PDGFr

befindet sich das Methionin in Position +3 sehr nahe an der Oberfläche der Struktur. Dies erinnert an das Fehlen von Kontakten der Position +2, für die in Experimenten keine Spezifität gefunden werden konnte [52]. Im Komplex des Wildtyps befindet sich die Seitenkette des Met +3 tiefer im Innern des Proteins. Die Position +3 wird im Wildtyp von F392 koordiniert, während sich dieser Rest in P395S deutlich von dieser Position entfernt befindet. Die Bindung des Liganden führt zu einem Verlust der Zuordnung der chemischen Verschiebungen für die Aminosäurereste der Schleife EF. Dies lässt auf eine erhöhte Flexibilität schließen, welche eine größere Anzahl von Strukturen für die Position +3 ermöglicht, was zum beobachteten Verlust der Spezifität führt. Dennoch ist es wichtig festzuhalten, dass trotz des Verlustes der Spezifität für den Aminosäurerest +3 dieser Aminosäurerest zur Gesamtaffinität beiträgt. Die Affinität des MT-Peptids ist höher als die Affinität eines veränderten Peptids mit Glycin anstelle von Methionin in +3. Es konnten viele Kontakte zwischen der Position +3 und der SH2-Domäne gefunden werden (K379, S380, I381, K382, L420).

Aufgrund dieser strukturellen Unterschiede, die durch die Mutation verursacht werden, verwundert die veränderte Spezifität für die Position +1 nicht. Hier wird Valin gegenüber Methionin von P395S bevorzugt. Dieses Valin in +1 befindet sich im Komplex mit P395S tiefer im Innern der Struktur als das gleichpositionierte Methionin im Komplex mit dem Wildtyp. Die Methylgruppen des Valin +1 wechselwirken mit der von K379 und, wenn auch in geringerem Maße, von I381 geformten hydrophoben Oberfläche im Faltblatt β D. Die Untersuchung der Struktur ergibt, dass ein Methionin in +1 dem Lösungsmittel aufgrund der längeren Seitenkette einen erheblichen Teil an hydrophober Fläche präsentiert (s. Abb. 39).

Die Änderungen der chemischen Verschiebungen bei der Bindung des MT bestätigt eine Präferenz für Valin in +1 in P395S. Es konnten klare Unterschiede im Verhalten der Bindung von MT zwischen sowohl der Wildtyp-SH2-Domäne als auch der P395S-SH2-Domäne im Vergleich zur Bindung des PDGFr gesehen werden. Um diese Unterschiede zu verstehen, ist es erforderlich, die Änderungen der chemischen Verschiebungen bei Bindung der beiden Peptide in P395S mit den gleichen Änderungen in der Wildtypstruk-

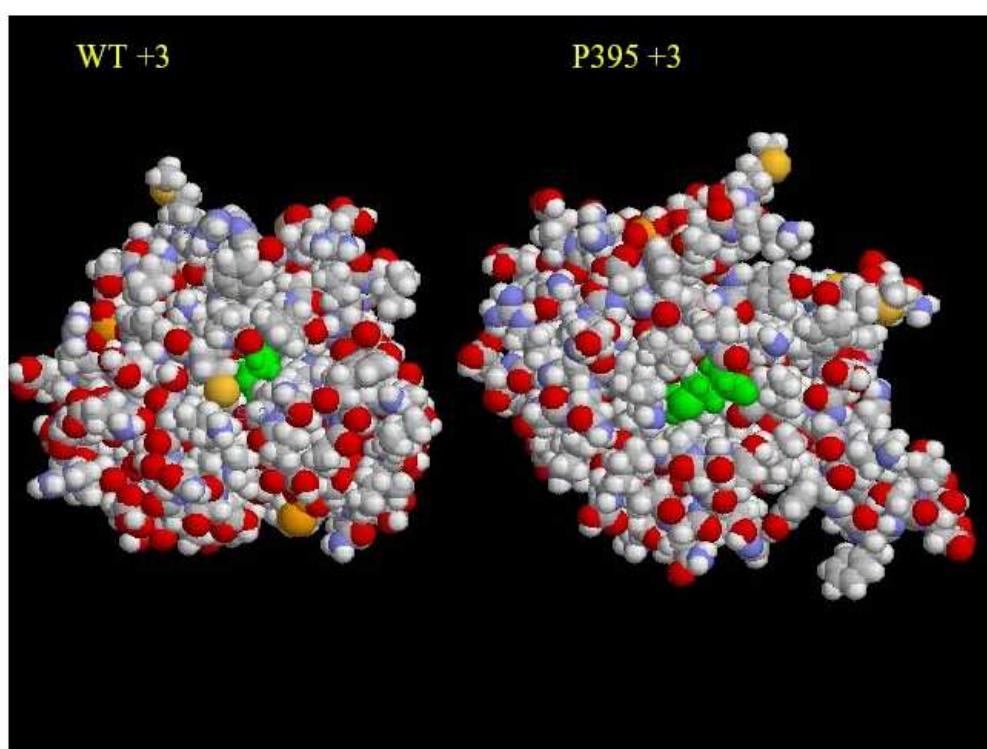


Abbildung 39: Kugelmodell des Komplexes von Wildtyp und P395S SH2. Der Methioninrest in Position +3 ist grün dargestellt.

tur zu vergleichen. In P395S zeigen etwa doppelt so viele Aminosäurere-
ste große (>0.6 ppm) Änderungen der chemischen Verschiebungen wie im
Wildtyp. In Abb. 38 sind diese Unterschiede zwischen P395S und Wildtyp
($[(5\Delta\delta^1H + \Delta^{15}N)_{MT} - (5\Delta\delta^1H + \Delta^{15}N)_{PDGFr}]_{P395S} - [(5\Delta\delta^1H + \Delta^{15}N)_{MT} -$
 $(5\Delta\delta^1H + \Delta^{15}N)_{PDGFr}]_{WT}$) zusammengefasst. Die größte Änderung zeigt
hierbei F392 in der Nähe der Mutationsstelle. Die Schleife BG (A414, Y416,
K419 und L420) und die Helix α B (H407, Y408) zeigen signifikante Unter-
schiede. Diese Region der Struktur ist verantwortlich für die verminderte
Bindung des MT mit Methionin in Position +1.

5 Zusammenfassung

Aufgrund der Vielzahl an SH2-enthaltenden Proteinen und einer ebenso großen Anzahl potentieller tyrosinphosphorylierter Ziele, besteht ein enormes Interesse daran, die Spezifität von SH2-Domänen zu verstehen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Einblick in die Struktur und die Funktion einer Mutante der N-SH2-Domäne der PI3-Kinase zu geben [53].

Die Mutante P395S offenbart eine Reihe interessanter struktureller Fragen; eine Mutation in einer Schleifenregion an der Oberfläche, die an der Koordination des Restes in Position +3 beteiligt ist, verursacht eine Änderung der Bindungsspezifität für den Rest in Position +1. Verglichen mit dem Wildtyp ist P395S nicht in der Lage, Polyomavirus Middle T Antigen (pYMPM) zu binden. „Peptide fishing“-Experimente [17] zeigen, dass P395S tatsächlich einen Verlust der Spezifität für die Position +3 nach dem Phosphotyrosin erfährt. Als biochemische Grundlage wird die Beobachtung betrachtet, dass P395S ebenso eine Änderung der Spezifität für die Position +1 erfährt. Hier wird nun ein Valin einem Methionin bevorzugt. Diese Änderung kompensiert den Verlust der Spezifität für die Position +3 und erlaubt P395S weiterhin PDGFr (pYVPM) zu binden. Middle T hingegen bindet schwächer an P395S als an den Wildtyp, da es ein Methionin in Position +1 besitzt. Strukturen sind sowohl für die freie P395S SH2 als auch für einen SH2-PDGFr-Komplex bestimmt worden. Die Änderungen der chemischen Verschiebungen für den Wildtyp und die Mutante sind verglichen worden. Die Resultate ergeben eine befriedigende Erklärung für das Verhalten von P395S SH2.

Die Analyse der Struktur von P395S SH2 zeigt einen deutlichen Effekt. EF hat den Kontakt zum Rest der Proteinstruktur verloren. Spezifische Wechselwirkungen wie die Stapelung von F392 und Y416 fehlen. BG befindet sich dadurch in P395S näher am zentralen Faltblatt, ebenso ist die Flexibilität dieser Scheife erhöht. α B nimmt eine dem zentralen Faltblatt nähere Position ein. β D ist so gedreht, dass I383 und F384 veränderte Positionen einnehmen. Diese Strukturunterschiede zwischen dem Wildtyp und P395S spiegeln sich ebenso in der Analyse der Änderung der chemischen Verschiebungen von C $^{\alpha}$ und in einem ^{15}N -HSQC-Spektrum wider. Frühere Studien mit veränderten

Peptidliganden haben gezeigt, dass die N-SH2 eine hochinteraktive Struktur besitzt [8]. Die Resultate aus der Untersuchung von P395S unterstreichen erneut die flexible Natur der SH2-Struktur.

Bei der Bindung des Liganden erfährt P395S signifikante Strukturveränderungen. Die Reste F392 und S395 konnten nicht zugeordnet werden, somit konnte keine detaillierte Strukturinformation über EF erhalten werden. Das Faltblatt β D und die BG-Schleife bewegen sich bei Ligandenbindung voneinander weg. Der N-Terminus von α B bewegt sich auf das zentrale Faltblatt zu, während sich der C-Terminus davon entfernt. Diese Änderungen lassen sich auch in einer großen Anzahl von Änderungen der chemischen Verschiebungen bei Bindung des Liganden erkennen. Hier verhält sich die Mutante ähnlich wie der Wildtyp [8].

Die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen legen zwei Erklärungen für den Verlust der Spezifität für die Position +3 nahe. Das Methionin in Position +3 in PDGFr ist der Oberfläche der Struktur zugewandt. α B befindet sich näher am zentralen Faltblatt, dadurch wird die Möglichkeit, die Seitenkette des Restes in +3 in die Struktur zu integrieren verringert. Des weiteren nähert sich EF nicht an den Rest in +3 an, so dass eine offene Struktur entsteht. Berechnungen der Zugänglichkeit der Oberfläche zeigen jedoch eine hohe Packung des Liganden (s. Abb. 41). In der Wildtypstruktur koordiniert F392 die Position +3, in P395S befindet sich F392 entfernt von dieser Position. Die Flexibilität innerhalb dieser Region könnte zu einer erhöhten Vielfalt an Strukturen in der Position +3 führen, was den beobachteten Verlust der Spezifität erklärt. Hierbei ist zu beachten, dass trotz des Verlustes der Spezifität für die Position +3 eben dieser Rest erheblich zur Gesamtaffinität für den Liganden beiträgt. Die Affinität für das MT-Peptid ist höher als für ein vergleichbares Peptid mit einem Glycin anstelle des Methionins in +3. Des weiteren können Kontakte der Aminosäurereste K379, S380, I381, K362 und L420 zum Rest in Position +3 beobachtet werden.

Das Valin in +1 ist in der Struktur des Komplexes mit P395S tiefer im Inneren des Proteins als das Methionin in +1 in der Struktur des Komplexes mit dem Wildtyp. Die Methylgruppe des Valins in +1 im Liganden interagiert mit der von K379 und zu einem geringeren Anteil von I381 gebildeten hydro-

phoben Oberfläche in β D. Ein Methionin in +1 würde dem Lösungsmittel ohne weitere Strukturveränderungen des Proteins eine beachtliche hydrophobe Oberfläche aussetzen.

Es können deutliche Unterschiede in der Änderung der chemischen Verschiebungen sowohl für die Wildtyp-SH2 als auch für P395S SH2 gesehen werden, wenn die Ergebnisse der Bindung des MT-Peptids mit den Ergebnissen der Bindung von PDGFr verglichen werden (s. Abb. 4.3.2). Hierbei zeigt sich, dass in P395S etwa doppelt so viele Aminosäurereste als im Wildtyp Änderungen der chemischen Verschiebung $>0,6$ ppm erfahren. Die größte Änderung zeigt hier F392 in der Nähe des Mutationsortes.

A Anhang

A.1 Steuerdateien für die Strukturrechnung mit DYANA

A.1.1 dyana.csh

```
nice -19 dyana << EOF

calc_all 100 steps=6000

overview p395s 50 hbond vdw structures select 1..20 write_all
p395s pdb

distance check >distancecheck

distance stat >distancestat

dcostat file=dcostat

longrangeplot file=longrangeplot

seqplot

exit

EOF
```

A.1.2 init.dya

```
protocol:=p395s.log

info:=full name:=p395s # protein name (used as file name)

rmsdrange:=8..111 # default residue range for RMSD

read lib ../../../../dyana_mod_pty.lib # read library

read seq ../../../../p395s.seq # read sequence

read upl final.rstrntrd # read upper limit restraints

read aco P395S.aco # read angle constraints
```

A.2 Steuerdatei für die Energieminimierung mit DISCOVER

```
!INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY primus

!

!

overlap = 0.01

cutoff = 15.000000

cutdis = 14.000000

swtdis = 1.5

begin simulation

* add-automatic bond torsion valence out-of-plane

* for unfound bond torsion valence out-of-plane continue

reduce

!

set dielectric = 1.0000*r

!

constrain using "p395s.rstrnt"

cscale = 5.0

!

nstruc = 20
```

```
nsd = 100

ncg = 800

!

loop = 1

!

nr = nstruc

!

!

Lk retrieve file number loop

!

!

Fixed atom list generation

* add main

* molecule 1 residue GLY 1 to TYR 111

!

Minimize

* no cross terms

* no morse

* for nsd iterations

* using steepest descent
```

```
* until the maximum derivative is less than 0.500000 kcal/A

!

fix nothing

!

Minimize

* no cross terms

* no morse

* for nsd iterations

* using steepest descent

* until the maximum derivative is less than 1.000000 kcal/A

!

cscale = 2.0

!

Minimize

* no cross terms

* no morse

* for ncg iterations

* using conjugate gradient

* until the maximum derivative is less than 0.01000000 kcal/A

!
```



```
!  
  
nr = nr + 1  
  
archive as file number nr  
  
loop = loop + 1  
  
log energy summary  
  
log noe_dist violations exceeding 0.2 angstroms  
  
log noe_dist violations exceeding 0.3 angstroms  
  
log noe_dist violations exceeding 0.4 angstroms  
  
log noe_dist violations exceeding 0.5 angstroms  
  
!  
  
if loop .le. nstruc then Lk  
  
!  
  
!  
  
end
```

B Literatur

Literatur

- [1] Tony Pawson and Gerald D. Gish. SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell*, 71(3):359–62, 1992.
- [2] L. Marengere, Z. Songyang, G. Gish, M. Schaller, J. Parson, M. Stern, L. Cantley, and T. Pawson. SH2 domain specificity and activity modified by a single residue. *Nature*, 36(9):502–5, 1994.
- [3] L. C. Cantley, K. R. Auger, C. Carpenter, B. Duckworth, A. Graziani, R. Kapeller, and S. Soltoff. Oncogenes and signal transduction [published erratum appears in cell 1991 may 31;65(5):following 914]. [review]. *Cell*, 64(2):281–302, 1991.
- [4] Zhou Songyang, Steven E. Shoelson, Manas Chaudhuri, Gerald Gish, Tony Pawson, Wayne G. Haser, Fred King, Tom Roberts, Sheldon Ratnofsky, and et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*, 72(5):767–78, 1993.
- [5] Z. Songyang, S. Blechner, N. Hoagland, M. F. Hoekstra, H. Piwnicka-Worms, and L. C. Cantley. Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Current Biology*, 4(11):973–82, 1994.
- [6] T. Weber, B. Schaffhausen, Y. Liu, and U. Günther. NMR structure of the N-SH2 of the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase complexed to a doubly phosphorylated peptide reveals a second phosphotyrosine binding site. *Biochemistry*, 39:15860–9, 2000.
- [7] MJ Eck, SE Shoelson, and SC Harrison. Recognition of a high-affinity phosphotyrosyl peptide by the Src homology-2 domain of p56lck. *Nature*, 6415(362):87–91, 1993.
- [8] Ulrich Günther, Yuxi Liu, David Sanford, William W. Bachovchin, and B. Schaffhausen. NMR analysis of interacions of a PI-3 kinase SH2

- domain with phosphotyrosine peptides reveals interdependence of major binding sites. *Biochemistry*, 35(48):15570–15581, 1996.
- [9] R. T. Nolte, M. J. Eck, J. Schlessinger, S. E. Shoelson, and S. C. Harrison. Crystal structure of the PI 3-kinase p81 amino-terminal SH2 domain and its phosphopeptide complexes. *Nature Structural Biology*, 3(4):364–74, 1996.
- [10] J. Kuriyan and D. Cowburn. Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, (26):259–88, 1997.
- [11] M. Hesse, H. Meier, and B. Zeeh. Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart*, 4. Aufl., 1991.
- [12] R. Ernst and W. Anderson. Application of Fourier transform spectroscopy to magnetic resonance. *Rev. Sci. Instr.*, 37:93–102, 1966.
- [13] J. Jeener. Lecture at Ampere Summer School, Yugoslavia. 1971.
- [14] W. Aue, E. Bartholid, and R. Ernst. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.*, 64:2229–46, 1976.
- [15] Kurt Wüthrich. NMR of Proteins and Nucleic Acids. *A Wiley Interscience Publication*, 1986.
- [16] J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, and N. J. Skelton. Protein NMR Spectroscopy. *Academic Press*, 1996.
- [17] M. Yoakim, W. Hou, Z. Songyang, Y. Liu, L. Cantley, and B. Schaffhausen. Genetic analysis of a phosphatidylinositol 3-kinase SH2 domain reveals determinants of specificity. *Mol. Cell. Biol.*, 14(9):5929–38, 1994.
- [18] L. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, and A. Bax. Three-dimensional Triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins. *J. Magn. Res.*, 89:496–514, 1990.

-
- [19] G. Morris and R. J. Freeman. Enhancement of Nuclear Magnetic Resonance signals by Polarization Transfer. *J. Am. Chem. Soc.*, 101:760–2, 1979.
- [20] A. Bax and M. Ikura. An efficient three-dimensional NMR Technique for correlating the Proton and Nitrogen-15 Backbone Amide resonances with the Alpha Carbon of the preceeding Residue in uniformly $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ enriched proteins. *J. Biomol. NMR*, 1:99–104, 1991.
- [21] S. Grzesiek, J. Anglister, and A. Bax. Correlation of Backbone Amide and Aliphatic Side-Chain Resonances in $\text{C-}^{13}/\text{N-}^{15}$ -Enriched Proteins by Isotropic Mixing of C-^{13} Magnetization. *J. Magn. Res. B*, 101:114–119, 1993.
- [22] M. Wittekind, M. Gorlach, M. Friedrichs, G. Dreyfuss, and L. Mueller. ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR assignments and global folding pattern of the RNA-binding domain of the human hnRNP C proteins. *Biochemistry*, 31:6254–65, 1992.
- [23] D. Marion and A. Bax. Baseline correction of 2D FT NMR spectra using a simple linear prediction extrapolation of the time-domain data. *J. Magn. Reson.*, 83:205–211, 1989.
- [24] E. Zuiderweg, L. McIntosh, F. Dahlquist, and S. Fesik. Three-dimensional ^{13}C -resolved proton NOE spectroscopy of uniformly ^{13}C -labelled proteins for the NMR assignment and structure determination of larger molecules. *J. Magn. Res.*, 86:210–6, 1990.
- [25] K. Constantine, V. Goldfarb, M. Wittekind, J. Anthony, S. Ng, and L. Mueller. Sequential ^1H and ^{15}N NMR assignments and secondary structure of a recombinant anti-digoxin antibody VL domain. *Biochemistry*, 31:5033–43, 1992.
- [26] W. Fairbrother, A. Palmer III, M. Rance, J. Seizer, H. Saier, and P. Wright. Assignment of the aliphatic ^1H and ^{13}C resonances of the

- Bacillus subtilis glucose permease IIA domain using double- and triple-resonance heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 31:4413–25, 1992.
- [27] A. Bax, G. Clore, and A. Gronenborn. ^1H - ^1H correlation via isotropic mixing of C magnetization, a new three-dimensional approach for assigning ^1H and ^{13}C spectra of ^{13}C enriched proteins. *J. Magn. Res.*, 88:425–31, 1990.
- [28] L.E. Kay, P. Keifer, and T. Saarinen. Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.*, 114(10663-10665), 1992.
- [29] D. Wishart, C. Bigam, J. Yao, F. Abildgaard, H. J. Dyson, E. Oldfield, J. Markley, and B. Sykes. ^1H , ^{13}C and ^{15}N Chemical Shift Referencing in Biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR*, 6:135–40, 1995.
- [30] P. Pristovsek, H. Rüterjans, and R. Jerala. Semiautomatic sequence-specific assignment of proteins based on the tertiary structure: The Program NMR2ST. *J. Comput. Chem.*, 23:335–40, 2002.
- [31] D. S. Wishart, B. D. Sykes, and F. M. Richards. Relationship between Nuclear Magnetic Resonance chemical shift and protein secondary structure. *J. Mol. Biol.*, 22:311–33, 1991.
- [32] K. Oesapay and D. A. Case. Analysis of proton chemical shifts in regular secondary structure of proteins. *J. Biomol. NMR*, 4:215–30, 1994.
- [33] S. Spera and A. Bax. Empirical correlation between protein backbone conformation and C-alpha and C-beta. ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance chemical shifts. *J. Am. Chem. Soc.*, 113:5490–92, 1991.
- [34] P. Luginbühl, T. Szyperski, and K. Wüthrich. Statistical Basis for the use of ^{13}C chemical shifts in Protein Structure Determination. *J. Magn. Res.*, 109:229–33, 1995.
- [35] D. Wishart and B. D. Sykes. Chemical shifts as a tool for structure determination. *Academic Press, Methods in Enzymology*, 239c.

-
- [36] D. B. Beger and P. H. Bolton. Protein phi and psi dihedral restraints determined from multidimensional hypersurface correlations of backbone chemical shifts and their use in the determination of protein tertiary structures. *J. Biomol. NMR*, 10:129–42, 1997.
- [37] C. Redfield and J. Robertson. Proceedings of a NATO advanced research workshop on computational aspects of the study of biological macromolecules by NMR. *Plenum Press*, New York NY, 1991.
- [38] D. S. Wishart, M. S. Watson, R. F. Boyko, and B. D. Sykes. Automated ^1H and ^{13}C chemical shift prediction using the BioMagResBank. *J. Biomol. NMR*, 10:329–36, 1997.
- [39] G. Cornilescu, F. Delaglio, and A. Bax. Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR*, 13:289–302, 1999.
- [40] P. Güntert, C. Mumenthaler, and K. Wüthrich. Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.*, 273:283–98, 1997.
- [41] F. Momany, R. McGuire, A. Burgess, and H. Sheraga. Energy parameters in polypeptides. VII: Geometric parameters, partial atomic charges, nonbonded interactions, hydrogen bond interactions and intrinsic torsional potential for the naturally occurring amino acids. *J. Phys. Chem.*, 79:2361–81, 1975.
- [42] A. Bruenger. X-PLOR, Version 3.1. A system for X-ray, Crystallography and NMR. *Yale University Press*, New Haven USA, 1992.
- [43] M. Allen and D. Tildesley. Computer Simulation of Liquids. *Clarendon Press*, 1987.
- [44] A. Mathiowetz, A. Jain, N. Karasawa, and W. Goddard. Protein simulation using techniques suitable for large systems: the cell multipole method for nonbond interactions and the Newton-Euler inverse mass

- operator method for internal coordinate dynamics. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 20:227–47, 1994.
- [45] H. Berendsen, J. Postma, W. van Gunsteren, A. DiNola, and J. Haak. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, 81:3684–90, 1987.
- [46] P. Güntert. Neue Rechenverfahren für die Proteinstrukturbestimmung mit Hilfe der magnetischen Kernspinresonanz. *Dissertation*, 10135 ETH Zürich, 1993.
- [47] Paul C. Driscoll, G. Marius Clore, Dominique Marion, Paul T. Wingfield, and Angela M. Gronenborn. Complete resonance assignment for the polypeptide backbone of Interleukin 1 beta using three-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 29(14):3542–56, 1990.
- [48] G. Gemecker, E. Olejniczak, and S. Fesik. An improved method for selectively observing protons attached to ^{12}C in the presence of ^1H - ^{13}C spin pairs. *J. Magn. Reson.*, 96:199–204, 1992.
- [49] Andrew M. Petros, Gerd Gemmecker, Placido Neri, Edward T. Olejniczak, David Nettesheim, Robert X. Xu, Earl G. Gubbins, Harriet Smith, and Stephen W. Fesik. NMR studies of an FK506 analog, [U- ^{13}C]ascomycin, bound to FK-506-binding protein. *J. Med. Chem.*, 35(13):2467–73, 1992.
- [50] R. Laskowski, J. Rullmann, M. MacArthur, R. Kaptein, and J. Thornton. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for Checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR*, 8:477–86, 1996.
- [51] R. Koradi, M. Billeter, and K. Wüthrich. MOLMOL: A program for Display and Analysis of Macromolecular Structures. *J. Mol. Graphics*, 14:51–55, 1996.
- [52] M. Yoakim, W. Hou, Y. Liu, C. L. Carpenter, R. Kapeller, and B. S. Schaffhausen. Interactions of polyomavirus middle T with the SH2 do-

- mains of the p85 subunit of phosphatidylinositol-3-kinase. *J. Virol.*, 66(9):5485–91, 1992.
- [53] U. Günther, B. Weyrauch, X. Zhang, and B. Schaffhausen. NMR structure of the P395S mutant of the N-SH2 domain of the p85 subunit of PI3 kinase: An SH2 domain with altered specificity. *Biochemistry*, 42:11120–27, 2003.

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter zu Hilfenahme der angegebenen Mittel und der im Literaturverzeichnis angegebenen Publikationen angefertigt zu haben. Die Arbeit wurde in keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht.

Darmstadt,

Bernd Weyrauch

Lebenslauf

Name: Bernd Weyrauch

Wohnort: Nieder-Ramstädter-Str. 14
64283 Darmstadt
Tel.: 06151/666166

Geburtsdatum: 06.09.1970

Geburtsort: Darmstadt

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Ausbildung

1976 – 1980 Grundschule

1980 – 1990 Gymnasium, Abschluß: Abitur

1990 – 1991 Grundwehrdienst bei 6. FlaRakG in Schöneck

1991 – 1997 Studium Fachrichtung Chemie an der TH Darmstadt,
Abschluß: Dipl.-Ing.
Diplomarbeit bei Prof. Dr. Dencher mit dem Thema:
„Biochemische Charakterisierung oxidativ modifizierter
Proteine und Lipide“

1997 – 2001 Promotionsarbeit an der J.W. Goethe-Universität
Frankfurt bei Prof. Dr. Rüterjans

Seit 01.10.2001 Angestellt bei NaWoTec GmbH / Carl Zeiss SMT AG in
Roßdorf

Publikationen

U. Günther, B. Weyrauch, X. Zhang & B. Schaffhausen, *Biochemistry* **2003**, *42*, 11120-27
„Nuclear Magnetic Resonance Structure of the P395S Mutant of the N-SH2 Domain of the
p85 Subunit of PI3 Kinase: An SH2 Domain with Altered Specificity“